

**Gonçalo Cavaco**

**Unveiling a putative hairy-microtubules protein  
interaction in early *Drosophila* development**



**Gonçalo Cavaco**

# **Unveiling a putative hairy-microtubules protein interaction in early *Drosophila* development**

Mestrado de Ciências Biomédicas- Mecanismos de Doenças

Trabalho orientado por

Rui Silva PhD

Raquel Andrade PhD



# **Unveiling a putative hairy-microtubules protein interaction in early *Drosophila* development**

Declaração autoral

Eu, Gonçalo José Teixeira Cavaco, declaro a autoria do presente trabalho, sendo este original e não publicado. Toda a literatura consultada e listada que se encontra presente na bibliografia, assim como a informação retirada da supramencionada literatura, é creditada aos autores da mesma

Copyright © Gonçalo Cavaco

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

*“A alma é tingida com a cor dos seus pensamentos”.*

Marco Aurélio - *Meditações*

## **Dedicatória**

Esta tese é dedicada ao meu pai, Jorge Cavaco, e ao meu avô, José Cavaco, que sempre me apoiaram e me incentivaram a almejar mais alto, mas que pelas peripécias da vida já não estão entre nós para celebrar o final de mais um feito que sempre desejaram ver. Dedico também esta tese aos meus orientadores, Rui Silva e Raquel Andrade, por toda a sabedoria, compreensão, paciência e disponibilidade que demonstraram ao longo deste projeto, apoiando-me para lá do necessário e incentivando-me a manter o foco e a não desistir. A vocês, um abraço e um obrigado do fundo do coração.

## **Agradecimentos**

Quero agradecer antes de mais aos meus orientadores, Rui Silva e Raquel Andrade, pela disponibilidade, sabedoria, espírito crítico e por me ajudarem a chegar aonde me encontro hoje. Sem vocês para me guiarem ao longo deste projeto eu não teria chegado tão longe. Quero também agradecer aos meus amigos e colegas André Jesus, Nísia Martins, Ana Modesto e Inês Militão. Sem vocês e a capacidade que demonstraram para me ouvir, aconselhar, ajudar e dar ânimo para continuar eu não teria conseguido terminar esta tese tão facilmente. Quero também agradecer à minha irmã, Soraia Cavaco, que sempre esteve presente na elaboração desta tese e que me suportou sempre, mesmo sem ter conhecimento sobre o tema. A ti minha irmã, só te tenho a agradecer por seres como és. Por fim, quero agradecer à minha família e amigos por todo o apoio que me deram e que continuam a dar. O vosso apoio foi indispensável.

## Abstract

Animal development requires careful spatiotemporal positional information. Such information allows development of the different organs and tissues in the correct order and position during subsequent steps of differentiation. In *Drosophila* this is achieved through segmentation which divides the embryo in 14 segments: 3 segments make up the head with its antennae and mouth parts, 3 segments make up the thorax and 8 the abdomen.

In *Drosophila* early embryogenesis, the embryo undergoes 13 rounds of rapid, synchronized nuclear division without cytokinesis, leading to the formation of a syncytial blastoderm with more than 6000 nuclei in a shared cytoplasm. The molecular events leading to larvae body segmentation are initiated by maternally derived signals and propagated by a genetic cascade of more than 30 different genes, culminating in the establishment of segment-specific gene expression patterns. To this purpose, the protein of that gene can only execute its function when it is in the correct position in the shared cytoplasm. This is achieved by selective silencing and active transport of the mRNA to the correct position, a process that normally requires the recognition of cis-acting elements, formation of ribonucleoproteins and Dynein-mediated transport along microtubules. In several cases, protein localization remains normal in conditions in which RNA localization is abrogated, implying additional mechanisms for segment individualization.

*hairy* is a *Drosophila* pair-rule gene that regulates the development of alternate segments in the *Drosophila* embryo, and its mRNA location is achieved through dynein-mediated transport of RNA particles. Previous results from our lab found an interaction between chicken *hairy1* and microtubule proteins in a yeast two-hybrid screen. We hypothesize that microtubule interaction of the *hairy* protein is conserved in *Drosophila* and plays a role in segment individualization.

The aim of this master proposal is to investigate the interaction between *hairy* protein and microtubules in *Drosophila*. This will be performed using different genetic, biochemical and cell biology approaches. Namely, (1) *in vivo* imaging of *hairy* protein localization during successive stages of *Drosophila* embryo development, using a transgenic reporter line containing a fluorescent hairy fusion reporter; (2) sample preparation for *mass-spectroscopy* identification of hairy protein interactors; (3) *in toto* immunohistochemical detection of candidate hairy protein interactors; (4) *in vivo* imaging of hairy protein localization after microtubule depolymerization during early stages of development.



**Key Words:** hairy, microtubule, *pair-rule* gene, embryogenesis, *Drosophila*

## Resumo

O desenvolvimento animal requer informações espaço temporais cuidadosas. Essas informações permitem o desenvolvimento dos diferentes órgãos e tecidos na ordem e posição corretas durante as etapas subsequentes de diferenciação. Em *Drosophila*, isso é alcançado através da segmentação, que divide o embrião em 14 segmentos: 3 segmentos formam a cabeça com as suas antenas e partes bucais, 3 segmentos formam o tórax e 8 o abdômen.

Durante a embriogênese inicial de *Drosophila*, o embrião passa por 13 rondas de divisão nuclear rápida e sincronizada sem citocinese, levando à formação de uma blastoderme sincicial com mais de 6000 núcleos num citoplasma partilhado. Os eventos moleculares que levam à segmentação do corpo da larva são iniciados por sinais de origem materna e propagados por uma cascata genética composta por mais de 30 genes diferentes, culminando no estabelecimento de padrões de expressão génica específicos para cada segmento. Para este fim, a proteína desse gene só poderá executar a sua função corretamente localizada no citoplasma. Isto é conseguido através do silenciamento seletivo e do transporte ativo do mRNA para a posição correta, um processo que normalmente requer o reconhecimento de elementos cis-regulatórios, formação de ribonucleoproteínas e transporte mediado por dineína ao longo dos microtúbulos. Em vários casos, a localização da proteína permanece normal em condições nas quais a localização do RNA é abrogada, implicando mecanismos adicionais para a individualização dos segmentos.

*hairy* é um gene *pair-rule* de *Drosophila* que regula o desenvolvimento de segmentos alternados no embrião de *Drosophila*, e a localização do seu mRNA é alcançada através do transporte mediado por dineína de partículas de RNA. Resultados anteriores do nosso laboratório encontraram uma interação entre a hairy1 de galinha e proteínas de microtúbulos num ensaio de *two-hybrid* em levedura. Nós hipotetizamos que a interação com microtúbulos da proteína hairy é conservada em *Drosophila* e desempenha um papel na individualização dos segmentos.

O objetivo desta proposta de mestrado é investigar a interação entre a proteína hairy e os microtúbulos em *Drosophila*. Isto será realizado utilizando diferentes abordagens genéticas, bioquímicas e de biologia celular. Nomeadamente, (1) imagem in vivo da localização da proteína hairy durante sucessivas etapas do desenvolvimento do embrião de *Drosophila*, usando uma linha transgénica contendo um repórter de fusão fluorescente de hairy; (2) preparação de

amostras para identificação de interatores da proteína hairy por espectrometria de massa; (3) detecção imunohistoquímica *in toto* de interatores candidatos da proteína hairy; (4) imagem in vivo da localização da proteína hairy após a despolimerização de microtúbulos durante as primeiras fases de desenvolvimento

**Palavras-chave:** hairy, microtúbulos, gene *pair-rule*, embriogénese, *Drosophila*

# Índice

\_Toc192070617

<b>Dedicatória</b>	v
<b>Agradecimentos</b>	vi
<b>Abstract</b>	vii
<b>Resumo</b>	ix
<b>Índice de Figuras</b>	iv
<b>Índice de Tabelas</b>	v
<b>Lista de Abreviaturas</b>	vi
<b>I. Introdução</b>	1
<b>I.1 Desenvolvimento embrionário em mamíferos</b>	1
<b>I.2 Fertilização em mamíferos</b>	2
<b>I.3 Clivagem e diferenciação em mamíferos</b>	6
<b>I.4 Regulação da implantação</b>	8
<b>I.5 Endoderme primitiva</b>	12
<b>I.6 Gastrulação</b>	12
<b>I.6.1 Estabelecimento de eixos axiais: Antero-Posterior</b>	13
<b>I.6.2 Estabelecimento de eixos axiais: Esquerda-Direita</b>	14
<b>I.7 Organogénese</b>	15
<b>I.7.1 Desenvolvimento da endoderme</b>	16
<b>I.7.1.1 Desenvolvimento estrutural do trato digestivo</b>	16
<b>I.7.1.2 Desenvolvimento estrutural do trato respiratório</b>	17
<b>I.7.1.3 Especificação tecidual</b>	18
<b>I.7.2 Especificação tecidual do fígado</b>	18
<b>I.7.3 Especificação tecidual do pâncreas</b>	19
<b>I.8 Desenvolvimento da mesoderme</b>	20
<b>I.8.1 Segmentação embrionária</b>	20
<b>I.8.1.1 Desenvolvimento da mesoderme paraxial</b>	21
<b>I.8.1.2 Sómitogénese</b>	22
<b>I.8.1.2.1 Formação de sómitosómitos</b>	23
<b>I.8.2 Desenvolvimento da mesoderme lateral</b>	24
<b>I.8.2.1 Desenvolvimento cardíaco</b>	25
<b>I.8.2.2 Genes envolvidos da formação cardíaca</b>	26
<b>I.8.2.2.1 Desenvolvimento do septo cardíaco</b>	27
<b>I.8.2.3 Desenvolvimento do sistema vascular</b>	27
<b>I.8.2.3.1 Desenvolvimento vascular</b>	28

I.8.2.3.2	Desenvolvimento do tecido sanguíneo	29
I.8.3	Desenvolvimento da mesoderme intermédia	29
I.8.3.1	Formação do rim – Pronefrínio	30
I.8.3.2	Formação do rim – Mesonefrínio	31
I.8.3.3	Formação do rim – metanefrínio	32
I.8.3.4	Formação do botão uretérico	32
I.8.4	Desenvolvimento da mesoderme axial	33
I.8.4.1	Formação da notocorda	34
I.8.5	Desenvolvimento da ectoderme	35
I.8.4.3	Estabelecimento da placa neural	35
I.8.4.4	Desenvolvimento do tubo neural	36
I.8.4.5	Neurulação primária	37
I.8.4.6	Neurulação secundária	38
I.8.4.6	Neurulação juncional	38
I.9	Desenvolvimento de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
I.9.1	Embriogénese em <i>Drosophila melanogaster</i>	40
I.9.1.1	Desenvolvimento pré-fecundação	40
I.9.1.2	Desenvolvimento pós-fecundação	40
I.9.1.3	Estabelecimento dos eixos embrionários por ação de genes maternos	42
I.9.1.4	Estabelecimento dos fatores envolvidos no eixo antero-posterior	42
I.9.2	Formação do eixo antero-posterior	44
I.9.3	Estabelecimento da expressão de genes <i>gap</i>	45
I.9.3.1	Estabelecimento da expressão de genes <i>gap</i> na metade anterior – <i>Hunchback</i>	46
I.9.3.2	Estabelecimento da expressão de genes <i>gap</i> na metade anterior – <i>Knirps</i>	46
I.9.3.3	Estabelecimento da expressão de genes <i>gap</i> na metade anterior – <i>Kruppel</i>	47
I.9.3.4	Estabelecimento da expressão de genes <i>gap</i> na metade anterior – <i>Giant</i>	47
I.9.4	Estabelecimento da expressão de genes <i>pair-rule</i>	48
I.9.4.1	Estabelecimento dos genes <i>pair-rule</i> primários	49
I.9.4.1.1	Interação entre genes <i>pair-rule</i> primários e estabelecimento segmentar	50
I.9.5	Gastrulação	52
I.9.5.1	Estabelecimento das camadas germinativas	52
I.9.5.2	Desenvolvimento estrutural durante a gastrulação	53
I.9.5.2.1	Desenvolvimento do sulco cefálico	54
I.9.5.2.2	Desenvolvimento dos sulcos dorsais transversais	54
I.9.5.2.3	Formação do sulco ventral	55
I.9.5.2.4	Extensão antero-posterior	55

I.9.6 Estabelecimento das camadas germinativas	56
I.9.6.3 Estabelecimento da endoderme	58
I.10 Segmentação	58
I.10.1 Genes <i>gap</i>	59
I.10.2 Genes <i>pair-rule</i>	60
I.10.2 Genes <i>pair-rule</i> primários	60
I.10.3 Genes <i>pair-rule</i> secundários	64
I.10.4 Formação das bandas de expressão	67
I.10.5 Segmentação durante a gastrulação	68
I.10.5.1. Estabelecimento dos genes de polaridade segmentar	68
I.10.6 Formação dos parassegmentos	69
I.10.6.1. Consolidação dos limites interiores dos parassegmentos	71
I.11 Gene <i>hairy</i> , um gene <i>pair-rule</i> indispensável à organização embrionária	73
I.11.1 Expressão de <i>Hairy</i> durante o desenvolvimento embrionário	73
I.11.2 Controlo da expressão por parte de <i>Hairy</i>	74
I 12 Hipótese e objetivo	75
II Materiais e métodos	77
II.1 Protocolo de cultura e manutenção de <i>stocks</i>	77
II.2 Anestesia	77
II.3 Elaboração das placas de Petri revestidas	78
II.4 Elaboração das <i>cages</i> para recolha de embriões	79
II.5 Seleção de embriões em estádios de desenvolvimento específicos	79
II.6 Protocolo de descorionação	80
II.7 Protocolo de fixação	81
II.8 Protocolo de desvitelinização manual dos embriões de <i>Drosophila</i>	81
II.9 Protocolo de desvitelinização com recurso a metanol	82
II.10. Protocolo de <i>Staining</i>	83
II.11 Protocolo de <i>immunostaining</i>	83
II.12 Análise por microscopia e tratamento de resultados	85
II.13 Tratamento de imagens	85
II.14 Protocolo de <i>Polimerase Chain Reaction (PCR)</i>	86
II.15 Protocolo de preparação do gel de agarose a 1%	87
II.16 Preparação da eletroforese	2
III Resultados	3
1. Otimização de um protocolo para observação de proteínas em fusão com GFP em embriões de <i>Drosophila</i> após fixação química.	3

2.	Confirmação da inserção de <i>Hairy-GFP</i> no genoma de um <i>stock</i> de <i>Drosophila</i> .	6
3.	Observação da expressão de <i>Hairy-GFP</i> no <i>stock</i> de <i>Drosophila</i> selecionado	9
<b>IV Discussão</b>		11
1.	Otimização de um protocolo para observação de proteínas em fusão com GFP em embriões de <i>Drosophila</i> após fixação química	11
2.	Confirmação da inserção de <i>Hairy-GFP</i> no genoma de um <i>stock</i> de <i>Drosophila</i> .	15
3.	Observação da expressão de <i>Hairy-GFP</i> no <i>stock</i> de <i>Drosophila</i> selecionado	18
<b>V Conclusão e perspectivas futuras</b>		20
<b>VI Bibliografia</b>		21

# Índice de Figuras

Figura 1 - <b>Processo de fertilização em vertebrados.</b> .....	4
Figura 2 - <b>Desenvolvimento embrionário durante a fase de clivagem.</b> .....	8
Figura 3 - <b>Eclosão do embrião.</b> .....	10
Figura 4 - <b>Estabelecimento do eixo antero-posterior pela interação de Bicoid e Nanos.</b> .....	45
Figura 5 - <b>Expressão embrionária de Hunchback ao longo do eixo antero-posterior.</b> .....	46
Figura 6 - <b>Expressão embrionária de Knirps ao longo do eixo antero-posterior.</b> .....	47
Figura 7 - <b>Expressão embrionária de Kruppel ao longo do eixo antero-posterior.</b> .....	47
Figura 8 - <b>Expressão embrionária de Giant ao longo do eixo antero-posterior.</b> .....	48
Figura 9 - <b>Gráfico da expressão dos genes gap, ao longo da extensão antero-posterior do embrião.</b> .....	48
Figura 10 - <b>Distribuição das bandas de expressão de hairy, fushi tarazu e even-skipped durante a fase final da celularização e início da gastrulação.</b> .....	50
Figura 11 - <b>Representação esquemática da repressão realizada entre genes gap, genes pair-rule primários e genes pair-rule secundários antes da gastrulação.</b> .....	51
Figura 12 - <b>Representação esquemática das camadas germinativas num embrião de <i>D. melanogaster</i> durante a gastrulação.</b> .....	52
Figura 13 - <b>Movimentação das populações celulares durante a gastrulação em <i>D. melanogaster</i>.</b> .....	56
Figura 14 - <b>Interação entre genes gap no início da sua expressão e quando esta já se encontra estabelecida.</b> .....	60
Figura 15 - <b>Esquema da regulação dos fatores envolvidos na regulação da formação de parassegmentos embrionários.</b> .....	70
Figura 16 - <b>Equipamento utilizado para a seleção, tratamento e anestesia de <i>D. melanogaster</i>.</b> ..	78
Figura 17 - <b>Esquema das cages usadas para recolha de embriões.</b> .....	79
Figura 18 - <b>Representação esquemática de um embrião completo.</b> .....	80
Figura 19 - <b>Análise comparativa entre protocolos de desvitelinização química e desvitelinização manual de embriões de <i>D. melanogaster</i>.</b> .....	5
Figura 20 - <b>Confirmação da expressão de Hairy-GFP na linha de <i>Drosophila</i> utilizada.</b> .....	9
Figura 21 - <b>Análise da localização de Hairy-GFP durante o desenvolvimento primário de <i>D. melanogaster</i>, com idades compreendidas entre 80 e 180 minutos pós-fertilização.</b> .....	10



# Índice de Tabelas

*Tabela 1 - Stocks de Drosophila melanogaster utilizados durante o trabalho experimental.....Error!*  
**Bookmark not defined.**

## **Lista de Abreviaturas**

RNA - *Ribonucleic Acid*

ZP1 - *Zona Pellucida Sperm-binding protein 1*

ZP2 - *Zona Pellucida Sperm-binding protein 12*

ZP3 - *Zona Pellucida Sperm-binding protein 3*

PIP2 - *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

IP3 - *Inositol Trisphosphate*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

ISP1 - *Implantation Serine Proteinase 1*

ISP2 - *Implantation Serine Proteinase 2*

HBEGF - *Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*

EGF - *Epidermal growth factor*

FGF - *Fibroblast Growth Factor*

BMP - *Bone Morphogenetic Protein*

HOX – *Genes HomeoBox*

Cdx1 - *Caudal Type Homeobox 1*

Cdx2 - *Caudal Type Homeobox 2*

Cdx4 - *Caudal Type Homeobox 4*

Hhex - *Hematopoietically Expressed Homeobox*

Sox2 - *SRY-related HMG-box 2*

Foxa2 - *Forkhead Box Protein A2*

GATA2/6 - *GATA Binding Protein 2/6*

HGF - *Hepatocyte Growth Factor*

MPS - *Mesoderme Pré-Somítica*

SHH - *Sonic Hedgehog*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

GFP - *Green Fluorescent Protein*

# **I. Introdução**

## **I.1 Desenvolvimento embrionário em mamíferos**

A fase embrionária é o período entre a fecundação e o desenvolvimento de todas as estruturas anatómicas que estarão presentes no organismo após nascimento. Esta é caracterizada por uma rápida divisão celular em que o ovo fecundado, que inicialmente é só uma célula nucleada, sofre uma rápida sucessão de divisões que culminam na formação de um aglomerado de células, denominado de mórula. Esta mórula, que ao longo de todo o seu desenvolvimento, tem-se deslocado ao longo de todo o trato reprodutor feminino, termina a sua deslocação quando se encontra no útero, onde este vai-se fixar. É durante esta fixação que este começa a desenvolver todas as estruturas que vão promover um desenvolvimento completo do embrião: o embrião em si, o saco vitelino, córion e a placenta, assim como estruturas associadas que são necessárias para a manutenção de um ambiente estável, como o cordão umbilical e a cavidade amniótica.

Esta embriogénese pode ser dividida em quatro fases principais: fertilização, clivagem, gastrulação e organogénese<sup>1</sup>. Por fertilização compreende-se a fusão dos gametas, sendo essa fusão o mecanismo indutor do início de todo o desenvolvimento embrionário. A clivagem, que corresponde ao período entre a fecundação e a gastrulação, é caracterizada por uma rápida divisão mitótica, que dependendo do modelo pode ser total (mitose celular) ou só nuclear<sup>1</sup>. É também durante a clivagem que uma maior prevalência da expressão de RNAs maternos acumulados pré-fecundação é observada<sup>2</sup>. No final deste rápido desenvolvimento e replicação celular, ocorre a gastrulação. É durante a gastrulação que a realocação celular leva à formação das três camadas germinativas, conhecidas como ectoderme, mesoderme e endoderme. Será a partir destas três camadas que as diferentes estruturas corporais se desenvolverão<sup>1</sup>. Com o término da gastrulação é observada uma progressiva diferenciação tecidual baseada na camada de origem, sendo através dessa diferenciação que a organogénese ocorre, com base no tecido de origem. O objetivo desta diferenciação é a criação de todas as estruturas necessárias para o correto desenvolvimento posterior do organismo<sup>3</sup>.

## **I.2 Fertilização em mamíferos**

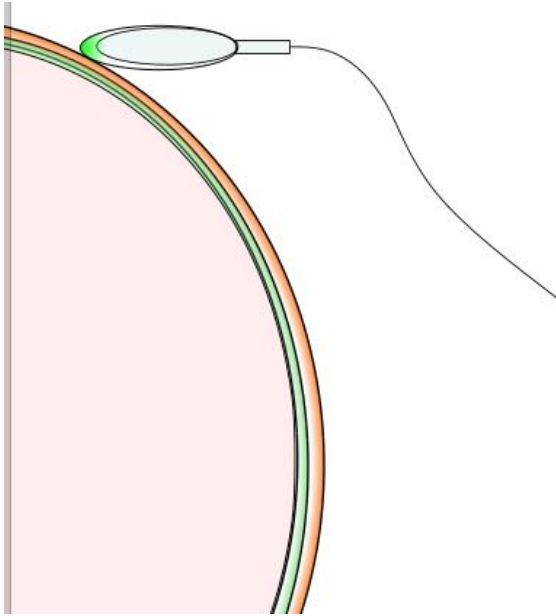
Em mamíferos, a embriogénese inicia-se quando acontece a fertilização, através da fusão do pronúcleo materno e o pronúcleo paterno. Este acontecimento, apesar de necessitar de ambas fontes de material genético, é maioritariamente controlado por mecanismos já previamente presentes no óvulo pré fertilizado. Estes mecanismos servem para maximizar a capacidade replicativa do embrião numa etapa inicial, usando como recurso reservas internas de nutrientes, assim como de RNA de diversos fatores envolvidos no controlo da expressão genica inicial. Exteriormente, esta também possui mecanismos que lhe possibilitam a correta permeabilização e acesso do gameta masculino, controlando a entrada deste. Este controlo é feito pela camada mais externa do óvulo, denominada de zona pelúcida<sup>4</sup>. Este processo de reconhecimento é conseguido, primeiro pela emissão de sinais termotáxicos e quimiotáxicos para atração do esperma, seguido do reconhecimento do embrião por interação com as glicoproteínas presentes na zona pelúcida<sup>1</sup>.

Esta zona, controlada por RNA de origem materna, tem como função reconhecer a compatibilidade do espermatozoide, assim como restringir o acesso a outros espermatozoides pós fertilização. Esta zona é constituída por duas camadas, a mais interna, denominada de *corona radiata*, corresponde à camada de células adjacentes à parede do óvulo. A camada mais externa, denominada de *cúmulos*, corresponde à camada mais externa de células que protegem e envolvem o óvulo, como observado na Figura 1. Estas células que englobam estas camadas são células foliculares cuja função prévia à ovulação é a do nutrir o oócito, assim como providenciar uma reserva de RNAs necessários para que haja um correto desenvolver do embrião no período pós fecundação. No período pós ovulatório, têm como principal função o reconhecimento do esperma, promover a integração do seu material genético no oócito e posteriormente prevenir a polispermia. Tal reconhecimento é dado através da presença de marcadores específicos de superfície celulares que são específicos à espécie. Quando um espermatozoide da mesma espécie reconhece os marcadores apresentados na membrana destas células, é iniciado o processo de fecundação. Este é caracterizado pelo reconhecimento positivo do oócito e células foliculares da mesma espécie, seguido de uma degradação gradual destas células por via de degradação enzimática por exocitose de vesículas acrossomais presentes no espermatozoide. Esta gradual degradação das células foliculares permite a aproximação do espermatozoide da membrana do oócito. Quando este entra em contacto com a membrana

celular, dá-se a fusão das membranas celulares de ambas células, seguida da fusão dos pronúcleos e início do desenvolvimento embrionário<sup>1</sup>.

Simultaneamente à fusão e início do desenvolvimento embrionário, o embrião necessita de impedir que ocorra polispermia. Em mamíferos, isto é conseguido de duas formas distintas: um bloqueio rápido, através da alteração do potencial de membrana aquando da fusão dos gâmetas; e por um bloqueio mais lento, marcado pela libertação de grânulos corticais que causam uma alteração gradual dos recetores de esperma na zona pelúcida, incapacitando-os de conectar outros espermatozoides<sup>5</sup>. A constituição destes grânulos é ainda pouco conhecida, mas sabe-se que uma das proteínas mais importantes neles contidas é ovastacina<sup>1</sup>. A ovastacina atua imediatamente após fertilização, sendo libertada na superfície. Esta proteína atua em três complexos da zona pelúcida: ZP1, ZP2 e ZP3, sendo a ZP1 e a ZP3 predominantes na superfície da zona pelúcida, enquanto a ZP2 é um recetor de reconhecimento de espermatozoide. Esta enzima atua nos complexos ZP1 e ZP3 através da hidrolisação da zona N-terminal da região repetitiva de Prolina-Glutamina presentes nestes complexos, causando um *cross-linking* destes complexos. Este *cross-linking* causa um aumento da rigidez da zona pelúcida, o que torna a entrada espermatozoides extra improvável<sup>6</sup>. Por outra via, a ovastacina atua no complexo ZP2, clivando-o. Esta clivagem impede a posterior acoplagem de outros espermatozoides<sup>7</sup>.

Outra proteína cuja alteração também causa um bloqueio da polispermia é a proteína Juno. Esta proteína, que inicialmente está envolvida na correta acoplagem do espermatozoide e que facilita a sua gradual integração no oócito, está presente na membrana do oócito. Quando se dá a fertilização, é observado que há uma rápida remoção da mesma da superfície. Esta remoção ocorre durante até uma hora após fertilização e tem como função a limitação da ligação de outros espermatozoides que possam causar uma perda de viabilidade por via de polispermia<sup>8</sup>.



*Figura 1 - Processo de fertilização em vertebrados.*

A fertilização ocorre pela interação entre a gonada masculina e feminina e envolve a gradual degradação da zona pelúcida (zona laranja) por via da degradação enzimática por via de enzimas acumuladas nas vesículas acrossomais (verde-claro). Estas são libertadas e degradam a zona pelúcida, permitindo o contacto do esperma com a superfície celular (verde-escuro) e levando à fusão membranar.

A ocorrência da fertilização induz também a ativação de todos os mecanismos indutores do desenvolvimento embrionário. No entanto, para esta ativação ocorrer de forma uniforme, é necessário um mecanismo que cause essa ativação. Este mecanismo é possível através da propagação de uma onda de cálcio.

O cálcio é um dos sinalizadores mais comumente encontrado no organismo, estando presente em várias vias de sinalização. No oócito, este mecanismo encontra-se suspenso até à fecundação, sendo toda a atividade deste basal. Num embrião de mamífero, esta onda de ativação por via de cálcio ocorre num muito breve espaço de tempo<sup>9</sup> e afeta todo o embrião. Esta é causada por uma libertação gradual, mas rápida, de cálcio armazenado.

O início da sua propagação ocorre pela interação do espermatozoide com a membrana do oócito. A interação destes dois gametas, quando se dá a ancoragem do espermatozoide à membrana do oócito, causa a reativação de vias de sinalização que usam cálcio como sinalizador, sendo este o indutor da libertação de cálcio armazenado. Esta onda propaga-se consequentemente do ponto de entrada do espermatozoide para toda a restante superfície do oócito e ocorre durante um período prolongado. A sua libertação não é, no entanto, espontânea.

A libertação de cálcio ocorre como consequência dos mecanismos da fusão dos gametas. O espermatozoide, ao se integrar gradualmente, liberta fatores que permitem a ativação da via de libertação de cálcio. Um dos alvos desses fatores é a tirosina cinase. Esta enzima ativa a fosfolipase C, outra enzima que cliva fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, ou PIP<sub>2</sub> em diacilglicerol

e inositol trifosfato, ou IP3. Este IP3 interage com recetores de IP3 presentes no retículo endoplasmático, levando à rápida libertação de cálcio presente neste. Esta libertação de cálcio, associado à conseqüente alcalinização do embrião, causa a rápida alteração da polaridade da membrana<sup>1</sup>.

Simultaneamente, a maior concentração de cálcio causa a gradual fusão dos grânulos corticais com a membrana, contribuindo para condensação da membrana e zona pelúcida<sup>10</sup>. O aumento gradual deste também causa mudanças na regulação interna do oócito. A maior concentração de cálcio causa uma gradual inativação dos bloqueadores mitóticos, assim como uma gradual ativação dos mecanismos de síntese de DNA<sup>1</sup>.

Todos os mecanismos presentes no recém-formado embrião servem um único propósito de negar a disrupção da fusão dos gâmetas, pela presença de material genético de um terceiro dador. A presença de um terceiro gâmeta torna o embrião inviável<sup>11</sup>. A correta fusão nuclear inicia-se com a fusão dos gâmetas. O esperma, após conseguir penetrar a zona pelúcida, entra em contacto com a membrana do oócito e dá-se a fusão das membranas. Esta fusão é potenciada por duas proteínas, presentes no gâmeta masculino e feminino. Estas são as proteínas izumo e juno, respectivamente<sup>12</sup>. A interação destas proteínas causa a acumulação e organização de proteínas transmembranares CD9, sendo que a acumulação deste responsável pela aproximação e posterior fusão das membranas<sup>12</sup>. Com a gradual acumulação de CD9 e progressiva fusão das membranas e integração do pronúcleo no citoplasma do oócito, o grande passo seguinte é a fusão dos dois pronúcleos, de forma a continuar a divisão mitótica em que o oócito se encontra bloqueado.

Apesar de ser observado noutros modelos, esta fusão não ocorre diretamente em mamíferos. Em mamíferos, o processo de fusão começa com o recrutamento de microtúbulos que interligam os dois pronúcleos e que os gradualmente aproximam. Estes microtúbulos não são, na sua totalidade, originados no oócito. Estes são originados em centrómeros presentes no espermatozoide que são integrados no citoplasma do oócito quando se dá a fusão e integração dos gâmetas. Estes, através do uso de reservas do oócito, desenvolvem microtúbulos que conectam e gradualmente aproximam os núcleos, sendo esta aproximação equidistante e ocorrendo no centro da célula. Quando próximos, os pronúcleos masculino e feminino desassociam-se, permitindo a mistura do material genético. Com esta fusão o processo meiótico termina e dá-se a formação e ativação do embrião, com o término da meiose<sup>13</sup>. Em mamíferos, este processo ocorre mais lentamente que noutros tipos de animais, sendo que o processo desde

a entrada do espermatozoide no oócito até ao término da segunda meiose ocorre num espaço de tempo de doze horas.

### **I.3 Clivagem e diferenciação em mamíferos**

Com a ocorrência de uma fertilização e ativação bem-sucedida do embrião, este começa o seu desenvolvimento. o seu desenvolvimento inicia-se com a clivagem. Esta clivagem, que ocorre entre o início da ativação do embrião e a sua implantação, é caracterizada por sucessivas divisões mitóticas contínuas que levam à criação de uma estrutura celular denominada de blastocisto. A forma como ocorrem estas divisões é altamente controlada. Na segunda divisão mitótica após a fertilização, as duas células já presentes vão-se dividir e estabelecer os padrões axiais que vão orientar a estrutura do blastocisto: uma célula vai-se dividir horizontalmente e estabelecer o eixo meridional e a outra vai-se dividir verticalmente e estabelecer o eixo equatorial. A esta organização dá-se o nome de clivagem rotacional<sup>14</sup>. Estas células continuam a dividir-se individualmente, sendo que inicialmente o processo é predominantemente suportado por proteínas e RNAs de origem materna que permitem a divisão continuada, sem interferência de material genético embrionário. No ser humano, a transição do controlo maternal para zigótica ocorre geralmente quando se observa a existência de oito células, que corresponde ao terceiro dia pós-fertilização. É durante esta etapa do desenvolvimento que os RNAs maternos deixam de ser traduzidos e o zigoto inicia a expressão génica<sup>4</sup>. Após esta etapa, a blástula continua a dividir-se enquanto se desloca até eventualmente se instalar no útero. É também durante esta deslocação e durante as sucessivas divisões que se dá a compactação. Este evento ocorre com o estabelecimento dos eixos e resulta num agrupado de células consecutivamente mais compactadas, estruturalmente agregadas por uma forte adesão fomentada por proteínas como E-caderinas. Esta adesão é mais exacerbada nas células da camada externa, sendo a camada interna menos compactada<sup>15</sup>.

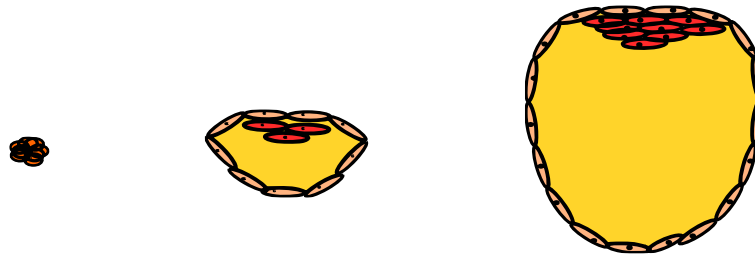
As divisões celulares sucessivas levam à formação de um agrupado de dezasseis células, onde já se observa diferenciação estrutural das células presentes. Estas células, a que a sua estrutura já é denominada de mórula, apresentam funções diferenciadas. As células no interior do blastocisto dão origem à camada celular interna, um precursor do embrião em si; enquanto a camada externa dá origem ao trofoblasto, sendo esta a estrutura acessória que permite a fixação e desenvolvimento estrutural das estruturas que irão suportar o desenvolvimento do embrião<sup>16</sup>.



A diferenciação destas células, que dão origem ao trofoblasto, parece estar associada a uma diminuição da expressão dos genes *Oct4* e *Nanog*, fatores de transcrição normalmente associados à manutenção da pluripotência celular, tendo sido observado que as células presentes na camada mais externa do blastocisto possuem uma menor expressão destes fatores de pluripotência<sup>17</sup>. Estes fatores são regulados pela presença da expressão do gene *homeobox cdx-2*<sup>17</sup>. *Cdx-2* está mais presente apicalmente, o que causa um gradiente de diferenciação celular, com maior impacto nas áreas mais afastadas do centro de massa celular<sup>17</sup>. As células na parte interior, pelo contrário, continuam a expressar *Oct4* e *Nanog*. Essa massa celular interna, irá originar o embrião e todas as estruturas associadas ao seu desenvolvimento<sup>18</sup>.

Durante a movimentação do blastocisto em direção ao local de nidação o embrião continua a dividir-se, dando-se simultaneamente alterações estruturais no embrião. A principal alteração observada nesta etapa é a cavitação. O processo de cavitação é processo pelo qual se dá um alargamento do embrião, através da acumulação de fluido no espaço interno do embrião. Este fluido é produzido pela ação de células pertencentes ao trofoblasto, através de movimentação osmótica causada pela introdução de sódio e potássio através de bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para o espaço intercelular que demarca os dois tipos celulares. As cavitações, inicialmente pequenas, começam a expandir graças à continuada introdução de íons no espaço, causando um aumento de volume. Quando duas cavitações de volumes diferentes entram em contacto, dá-se a união de ambas, sendo o volume da cavitação menor transferido para a cavitação maior por via de diferenças de pressão. Este processo é regulado por um mecanismo de feedback positivo em que uma maior pressão sobre as células do trofoblasto sinaliza uma maior entrada de íons o que promove a expansão do volume embrionário, como observado na Figura 2<sup>19</sup>.

As células do trofoblasto são as mais visadas, uma vez que o aumento de pressão e volume causam o alongamento destas células. Ao serem expostas a uma maior força tênsil, estas recrutam um número maior de proteínas de ancoragem, levando ao aumento da capacidade de ligação entre si. Quando atingindo o volume suportado máximo, o embrião será constituído por três partes bem definidas: trofoblasto, massa celular interna ou embrioblasto e blastocélio.



**Figura 2 - Desenvolvimento embrionário durante a fase de clivagem.** A mórula (figura à esquerda) é a estrutura resultante das primeiras divisões celulares sucessivas que ocorrem logo após a fertilização e é a partir desta estrutura que o embrião se desenvolve de forma mais complexa. Associado a este desenvolvimento, dá-se a cavitação: um aumento do volume interno do embrião (figura no centro), pela introdução de fluidos e pela formação e associação de cavidades internas. Esta estrutura transitória culmina na formação do blastocisto (figura à direita). O blastocisto é constituído pelo trofoblasto (células a laranja) que permite a conexão do embrião à parede uterina; massa celular interna (células a vermelho) que darão origem aos tecidos embrionários e o blastocélio (cavidade a amarelo) que é formado pela acumulação de fluido e que mantém o embrião em desenvolvimento num ambiente controlado.

#### **I.4 Regulação da implantação**

Durante o período de desenvolvimento do embrião a camada pelúcida, que até este ponto tinha como função a proteção e manutenção primeiramente do ócito e depois do embrião, ainda se encontra presente. Com o deslocar gradual do embrião ao longo do oviduto, a zona pelúcida passa a ser responsável pela prevenção da nidação do embrião neste trato, ao não permitir a interação entre o embrião e marcadores de membrana que permitem o reconhecimento e nidação do embrião<sup>20</sup>. A sua permanência após a passagem pelo oviduto é, no entanto, incompatível com um desenvolvimento viável do embrião.

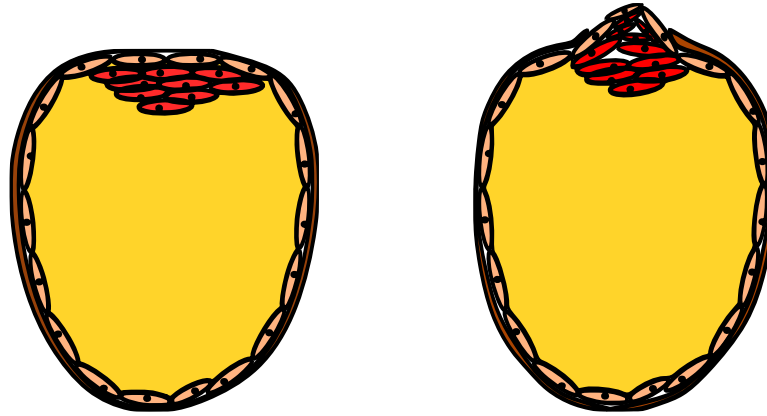
Para que tal não ocorra, o embrião precisa de se desagregar da zona pelúcida. Este acontecimento, denominado de eclosão, é o processo pelo qual o embrião se desagrega e fica capacitado para interagir e se fixar na parede uterina, sendo a sua ocorrência no final da sua deslocação pelo oviduto e entrada no útero. Esta ocorre pela degradação inicial de parte da membrana da zona pelúcida, permitindo que o embrião escape desta. A degradação ocorre maioritariamente em duas localizações distintas do embrião, comuns a todos os mamíferos com gestação intrauterina.

Estas ocorrem maioritariamente no polo embrionário (Figura 3), mais próximo da localização da massa celular interna, ou no polo abembrionário, localizada na extremidade oposta à camada

embrionária<sup>21</sup>. Esta degradação causa um gradual fragilizar da integridade estrutural da membrana, permitindo que o embrião se consiga extrair da mesma. A degradação ocorre por via proteolítica, promovida por via interna e externa. Destas destacam-se o *ISP1* e *ISP2*, ou *Implantation Serine Proteinase*, que são genes que codificam proteases que atuam ativamente na degradação da membrana. O *ISP1* é um gene embrionário expresso por células do trofoblasto e da camada endometrial que codificam a protease estripsina. Esta protease, semelhante à protease tripsina, atua por degradação proteica das proteínas presentes na zona pelúcida. O outro gene envolvido na degradação da zona pelúcida é o *ISP2*, que codifica outra protease denominada de lisina e cuja sua expressão encontra-se predominantemente na membrana endometrial<sup>22</sup>.

A ação promovida por estas enzimas é preponderante para a eclosão do embrião. Esta eclosão ocorre pela gradual fragilização da membrana que, associada ao contínuo aumento do volume do embrião por via da cavitação, causa uma maior tensão na área afetada, culminando no rompimento da membrana nesse ponto e na possibilidade do embrião se separar. Esta separação é gradual e culmina na completa dissociação entre embrião e a membrana da zona pelúcida. Com a completa dissociação, o embrião fica capacitado de interagir com a membrana endometrial e se estabelecer nesta, culminando na nidação deste.

A nidação é processo pelo qual o embrião interage, penetra e fixa-se na camada endotelial, culminando no desenvolvimento de estruturas anexas e do embrião que permitem o seu desenvolvimento. Esta marca a passagem entre o período pré-implementação e o início do período pós-implementação e ocorre no ser humano entre o sexto e o sétimo dia pós fertilização. Para que este processo ocorra, o embrião necessita de poder ser reconhecido pela membrana endométrica, assim como a membrana endométrica necessita de estar capacitada para reconhecer, interiorizar e facilitar o desenvolvimento de estruturas de suporte ao desenvolvimento do embrião. Para que haja o reconhecimento do embrião por parte da membrana endométrica, esta necessita de estar ativado.



*Figura 3 - Eclosão do embrião.* Na fase final da deslocação do embrião para o local onde este nidará, é necessário que este se separe da zona pelúcida que o envolve, caso contrário a nidação não será bem sucedida. Legenda: massa celular interna (vermelho), trofoblasto (laranja), blastocélio (amarelo) membrana pelúcida (castanho).

A ativação do embrião ocorre durante o terceiro dia pós fertilização, quando este é composto por 4 a 8 células e é caracterizado pela transição da expressão única de RNA de origem materna para expressão endógena por parte do material genético embrionário. Apesar de ativo, só após a eclosão deste da membrana pelúcida é que é possível para o embrião expressar fatores que lhe permitem reconhecer a membrana onde se irá implementar. Este reconhecimento é dado através da interação direta do embrião com a matriz extracelular formada pelas da camada endometrial. Estas células, que durante o desenrolar do ciclo reprodutor estão expostas a fatores hormonais como estrogénio e progesterona. Esta exposição causa o seu desenvolvimento mais acelerado e promove a formação de uma matriz extracelular capaz de facilitar a fixação, integração e desenvolvimento embrionário. A matriz formada é composta por diferentes tipos de lamininas e colagénio, assim como de caderinas, fibronectinas, ácido hialurónico, recetores de sulfato de heparano e diversas glicoproteínas<sup>1,23</sup>. São estes fatores que permitem o reconhecimento da membrana por parte do embrião.

O reconhecimento ocorre por via de sinalização que é igualmente expressa pelo embrião e pela superfície onde este se irá integrar. O reconhecimento ocorre é através de quimiotaxia<sup>24</sup>. Esta interação promove a aproximação do embrião ao local onde este se irá integrar.

Quando esta integração se inicia, tanto o embrião como a zona da membrana endometrial circundante à sua localização sofrem alterações. O embrião irá eventualmente nidar numa área do endométrio onde este apresente as condições necessárias para a retenção do mesmo, sendo esta caracterizada por um relevo mais cavitoso onde o embrião possa ser retido e começar a

integrar-se. Esta integração realiza-se pela inicial interação entre as células da camada endometrial, que se apresentam decidualizadas, e as células do trofoblasto embrionário, que através da interação entre glicoproteínas presentes na superfície celular das células constituintes do trofoblasto, assim como da matriz extracelular das células da camada endometrial, causam a agregação inicial entre estas duas estruturas. Esta agregação causa de igual forma causa uma resposta por parte das células do trofoblasto que promovem o aumento da sinalização que causa uma maior libertação de fatores de aderência por parte das células da camada endometrial<sup>25</sup>.

Estes fatores ajudam a coordenar todo o processo de gradual aproximação. Fatores como *heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF)*, trofinina e integrinas contribuem para a uma aproximação estável de ambas estruturas. A HBEGF contribui por interação com os recetores de sulfato de heparano e EGF presentes na membrana da trofoderme do blastocisto. Será através desta gradual interação que estruturas acessórias como a placenta são formadas<sup>26</sup>. A aproximação destas estruturas tem como função permitir a invasão e estabelecimento do embrião no tecido endometrial. Esta ocorre com o estabelecimento do sinciciotrofoblasto primordial, que facilita a fixação do blastocisto. O sinciciotrofoblasto primordial é a estrutura resultante da integração do embrião na parede endometrial, cuja função é o controlo das trocas gasosas e de nutrientes entre o embrião e organismo materno.

A fixação ocorre por fases, sendo que é iniciada pelo contacto entre a trofoderme e a membrana endometrial, com a proliferação de trofoblastos para o espaço entre as estruturas. A localização desta proliferação não é, no entanto, aleatória. Esta ocorre no polo embrionário, causando a gradual implantação da camada celular interna no tecido de suporte circundante. A proliferação trofoblástica leva à diferenciação gradual destas, que passam a denominar-se citotrofoblastos. Estes citotrofoblastos realizam simultaneamente duas ações: continuam a invadir a membrana endotelial e realizam uma gradual fusão celular.

Este último processo leva à gradual formação de uma célula de maior dimensão que se apresenta multinucleada. Estas sucessivas fusões levam à formação de uma estrutura multinucleada que engloba todas as células anteriormente fundidas e que passa a denominar-se de sinciciotrofoblasto. É este sinciciotrofoblasto que permite a permanente fixação do embrião à membrana endometrial. De igual modo, é através desta gradual fixação às camadas mais internas do endométrio que se dá o estabelecimento de todas as estruturas primitivas que levarão à formação dos órgãos anexos envolvidos no correto desenvolvimento embrionário e posteriormente fetal. É através desta agregação e estabelecimento do embrião que se dá o

desenvolver da via materna de suplementação, inicialmente por via de secreção glandular, que posteriormente é substituída por suplementação vascular.

### **I.5 Endoderme primitiva**

Com o estabelecimento do embrião na membrana endometrial e o início do desenvolvimento das estruturas anexas que permitem o correto desenvolvimento embrionário, a massa celular interna também começa a desenvolver-se. Esta começa por inicialmente dividir e formar duas camadas celulares distintas. Estas podem ser subdivididas conforme a sua proximidade para com o polo embrionário a trofoderme aí localizada. A camada celular mais próxima da trofoderme é denominada de epiblasto, enquanto a camada superficial reveste toda a superfície da camada celular interna é denominada de endoderme primitiva. É através do desenvolvimento desta endoderme primitiva que se irá desenvolver a camada endodermal do saco vitelino, assim como parte do tecido que leva à formação do trato digestivo. Por outro lado, o epiblasto é a camada celular cujo desenvolvimento leva à formação de todas as camadas embrionárias envolvidas no desenvolvimento embrionário<sup>27</sup>.

### **I.6 Gastrulação**

É durante a gastrulação que o embrião começa a sofrer alterações estruturais que vão permitir a correta formação de todas as estruturas necessárias para a correta formação de um organismo. Esta ocorre pela diferenciação tecidual do epiblasto, que se diferencia inicialmente no folheto primitivo e que dá origem às três camadas germinativas, sendo estas a endoderme, mesoderme e ectoderme.

A gastrulação inicia-se com o estabelecimento da transição epitélio-mesenquimal. Esta é demarcada pela propagação da massa celular para a zona anterior do embrião. Nesta propagação, as células presentes à superfície começam a migrar para o interior do embrião, estabelecendo a posição onde se formarão as três camadas germinativas. Esta migração é realizada através do recém-formado sulco primitivo irá ocupar duas áreas distintas. Um dos grupos de células que migram através do sulco primitivo invadem e ocupam parte do tecido do hipoblasto, levando ao estabelecimento da endoderme. Simultaneamente, outro grupo de

células invade de igual forma invade o epiblasto, estabelecendo-se entre a zona apical e a recém-formada endoderme. Este conjunto de células dá origem à mesoderme.

Com o estabelecimento da endoderme e mesoderme, a camada celular que inicialmente pertencia ao epiblasto irá diferenciar-se e dar origem à ectoderme<sup>28</sup>. Esta capacidade migratória ocorre por ação contrária à estabelecida estrutura inicial do epiblasto. O epiblasto, cujas células são mantidas de forma organizada através da expressão de caderinas, sofre alterações estruturais com o início da expressão de fatores que favorecem a migração celular, como fatores de crescimento fibroblásticos, também denominados de *Fibroblast Growth Factor (FGF)*<sup>1</sup>. A expressão de *FGF* causa uma inibição da expressão de caderina, o que promove a movimentação e migração celular.

Quando estabelecidas na localização que dará origem a cada uma das três camadas germinativas, a sua diferenciação é facultada pela diferente ação de genes específicos às células presentes na sua camada. Enquanto ocorrem estas movimentações celulares para o interior do epiblasto, na extremidade posterior do sulco primitivo dá-se o estabelecimento do nó primitivo. Este nó é composto por um aglomerado de células ciliadas, presente no polo basal e que são a origem da notocorda.

Com o estabelecimento das três camadas germinativas, dá-se também o estabelecimento dos eixos axiais que orientam a posterior expressão embrionária.

### **I.6.1 Estabelecimento de eixos axiais: Antero-Posterior**

Durante esta etapa inicial, o primeiro eixo a ser estabelecido é o eixo antero-posterior. Este eixo, que vai delimitar o posicionamento estrutural inicial do embrião em desenvolvimento, possui dois polos delimitadores: o nó primitivo, que delimita a extensão máxima do sulco primitivo e será onde a notocorda se irá desenvolver; e a endoderme visceral anterior, posicionada no polo anterior do embrião.

O estabelecimento destas estruturas iniciais (nó primitivo e endoderme visceral anterior) irá permitir o correto posicionamento das estruturas a se desenvolver e que vão estar presentes no organismo adulto. Estas duas posições não apresentam o mesmo tipo de expressão. Um dos fatores envolvidos na regulação geral do eixo é a proteína *fibroblast growth factor 8 (FGF8)*. Esta é expressa mais intensivamente na zona posterior do embrião, apesar de inicialmente a sua

concentração ser uniforme. Isto ocorre, pois, esta proteína que também está envolvida na coordenação de movimentos celulares durante a formação das três camadas germinativas, é gradualmente degradada pelo meio celular onde se encontra. Com o crescimento e alongamento que o embrião sofre, a resultante zona posterior tem uma concentração maior desta proteína visto que foi formada mais tarde. Simultaneamente, há a regulação de outros fatores envolvidos na formação do eixo. Em todo o tecido há uma dinâmica regulação de fatores envolvidos na regulação e especificação celular, como Nodal, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Wnt ou ácido retinóico e antagonistas destes fatores. A sua expressão ou inibição é coordenada pela maior ou menor presença de fatores que promovem ou previnem a expressão. Esta regulação, tal como acontece com o previamente mencionado *FGF8*, é conseguida pela posição no embrião em que a expressão ocorre.

A expressão é mais intensa na zona mais posterior (e por consequência mais recente) do embrião. Na extremidade anterior, não expressão destes fatores, sendo que aumenta gradualmente o quão mais afastado desse ponto se é observado. De igual forma, o eixo antero-posterior é igualmente regulado mais diretamente pela ação de um conjunto de genes denominado de *HomeoBox genes*, ou *Hox*. Este é um conjunto de trinta e nove genes cuja ação coordena a formação mais refinada de estruturas como o esqueleto e vértebras após a sómitogénese. A sua ação é dinâmica, já que a ativação destes genes é gradual e ocorre por ação da ativação dos genes envolvidos na regulação do segmento anterior<sup>29</sup>.

### **I.6.2 Estabelecimento de eixos axiais: Esquerda-Direita**

Tal como estabelecimento do eixo antero-posterior é importante para a determinação espacial das futuras estruturas embrionárias localizadas entre o polo anterior (que dá origem à cabeça) e o polo posterior (onde se localiza a cauda), é igualmente necessária a coordenação da localização onde as estruturas se localizam num plano longitudinal. Este plano, que coordena onde as diferentes estruturas e órgãos se vão desenvolver lateralmente, é importante para a correta localização de órgãos.

Este eixo é estabelecido, tal como o eixo antero-posterior, através de um gradiente de diferentes fatores. No entanto, contrário aos outros gradientes já mencionados, este é obtido por ação mecânica. Este gradiente é proporcionado pela diferente concentração de fatores como Nodal ou proteínas associadas ao mesmo. Nodal é observado em concentrações maiores no lado



esquerdo do embrião face ao lado oposto<sup>30</sup>. Isto é conseguido por ação mecânica. Esta ação mecânica é facilitada pela existência de células ciliadas especializadas para a movimentação de fluidos. Estas células, denominadas de células de *Crown*, apresentam cílios que são capazes de gerar movimentação do meio circundante através da sua motilidade.

Este tipo de movimentação causa a deslocação do fluido circundante para o lado esquerdo do embrião. Desta forma, toda a produção local de Nodal é transferida para o lado esquerdo, causando um gradiente por acumulação. No entanto, a sua movimentação não é intrínseca. Estas células apresentam inicialmente cílios sem qualquer capacidade de motilidade, uma vez que esta é inibida pela ação de *Cerberus*. Estas células são, no entanto, sensíveis ao meio onde se localizam<sup>1</sup>.

Um dos fatores que causa alterações na expressão génica destas células é, paradoxalmente, a aplicação de forças mecânicas que causem movimentação ciliar. Este tipo de força, como ocorre com a movimentação de fluido, causa a ativação de *Pkd2* ciliar que através de interação e sinalização acaba por causar a supressão da expressão de *Cerberus*. A inibição da expressão desta proteína causa por sua vez a capacitação da célula de reconhecer Nodal, podendo ser ativada por esta. Com a ativação da via promovida por Nodal, esta passa a ser expressa por estas células por via de ativação autócrina. Isto permite que a concentração de Nodal seja superior no lado esquerdo do embrião, assim como a movimentação ciliar causa o maior acumular da proteína no lado esquerdo. Esta acumulação apresenta consequências. A principal consequência desta movimentação e acumulação de Nodal é o estabelecimento de uma assimetria na expressão génica. Uma das consequências diretas da expressão de Nodal é a ativação de *Pitx*. A ativação de *Pitx* está envolvida no desenvolvimento de órgãos cuja simetria não é observada, como o fígado, coração, pulmões ou intestino. Este também está envolvido no processo de organogénese e desenvolvimento de outras estruturas corporais, como membros, crânio, cérebro e rede nervosa que cobre toda a área facial<sup>31</sup>.

## **I.7 Organogénese**

A organogénese é consequência das alterações na expressão e organização celulares. Esta é causada pela principal reorganização que o embrião em desenvolvimento sofre durante o estadio inicial do seu desenvolvimento, que corresponde ao estabelecimento das três camadas germinativas. Estas camadas, denominadas de endoderme, mesoderme e ectoderme, são o

resultado da migração das células pertencentes ao epiblasto através do sulco primitivo. A localização para onde estas células migram é baseada no tipo e localização de estímulo a que estão sujeitas durante este processo migratório.

Quando cessa a migração celular e os eixos axiais são estabelecidos, as células pertencentes a estas camadas de tecido embrionário iniciam o seu processo de diferenciação que potencia a formação de todos os órgãos e estruturas necessárias para o correto desenvolvimento do organismo. Esta diferenciação é potenciada pela exposição das células correspondentes a cada uma das três camadas germinativas a fatores específicos que lhes permitem desenvolver o tipo de tecido adequado. Canonicamente, a endoderme, mesoderme e ectoderme são os pontos de origem para a formação de todas as estruturas corporais.

Destas, é observado que é a partir da endoderme que os órgãos pertencentes ao trato digestivo e respiratório são formados. De igual modo, é a partir da mesoderme que os precursores do esqueleto os - sómitos - são originados. É também através desta camada que o coração, vasos sanguíneos, tecido sanguíneo e rins são igualmente originados. Por sua vez, é através da diferenciação da ectoderme que todo sistema nervoso e a pele são originados.

## **I.7.1 Desenvolvimento da endoderme**

### **I.7.1.1 Desenvolvimento estrutural do trato digestivo**

A endoderme é o folheto de células embrionárias cuja diferenciação dá origem a todos os tecidos constituintes de ambos tratos digestivo e respiratório. A origem deste tecido está intimamente conectada com a expressão prévia de fatores durante o estabelecimento das camadas germinativas e durante o estabelecimento do eixo antero-posterior. A expressão diferenciada é causada pela sua exposição a Nodal.

Este causa a expressão de fatores diferenciados, conforme a sua posição. No polo anterior a maior expressão de Nodal causa a expressão de fatores como *Hhex*, *Sox2* ou *Foxa2*. Por sua vez, a menor expressão de Nodal no polo posterior causa a expressão de diferentes genes *Hox*, como os genes *Cdx1*, *Cdx2* e *Cdx4*. Esta expressão é importante, uma vez que a maior expressão de *Hhex*, *Sox2* ou *Foxa2* causa a diferenciação das células deste polo nas células correspondentes às dos tecidos do trato gástrico superior, enquanto a expressão de genes *Hox*

no polo posterior causa a diferenciação destas células em tecidos correspondentes ao trato gástrico médio, assim como o estabelecimento da zona de transição entre estes<sup>32</sup>.

Com a indução da diferenciação, as células presentes na endoderme começam a sofrer alterações tanto na sua expressão como na sua distribuição estrutural. A primeira alteração observada no desenvolvimento deste tecido é o estabelecimento do tubo digestivo primordial. Durante este desenvolvimento, são inicialmente formadas duas cavidades, uma em cada extremidade do tubo. Estas são denominadas de portal intestinal anterior e portal intestinal caudal. Estas desenvolvem-se expandindo e cavitando. A expansão deste tecido culmina na conexão entre ambas cavidades, formando o tubo primitivo<sup>33</sup>.

### **I.7.1.2 Desenvolvimento estrutural do trato respiratório**

O trato respiratório não tem a sua origem numa diferenciação especializada de células do tecido embrionário, mas sim como a readaptação de células já diferenciadas para tecido do trato gástrico. A origem da formação deste tecido está na fase inicial do desenvolvimento do tubo primitivo, com a formação dos portais intestinais anterior e caudal. No portal anterior, a sua génese e desenvolvimento leva à formação dos tecidos e da estrutura da faringe. Esta estrutura é inicialmente constituída por quatro pares de cavidades distintas, denominadas de cavidades faríngeas, separadas por quatro estruturas que as conectam denominadas de arcos faríngeos. Cada um destes pares de cavidades faríngeas está envolvido na formação de estruturas associadas à cavidade faríngea.

Destes, o primeiro par de cavidades faríngeas dará origem às estruturas do ouvido médio, assim como às trompas de Eustáquio. O segundo par de cavidades faríngeas dá origem às paredes das amígdalas. O terceiro par dá origem ao timo. Este órgão, que não pertence aos tratos desenvolvidos a partir da endoderme, está envolvido no desenvolvimento, maturação e seleção de linfócitos T. De igual forma, também é através do desenvolvimento e diferenciação deste par que se dá o desenvolvimento de um par de glândulas paratiroides. O quarto par está envolvido na formação dos restantes pares de glândulas paratiroides.

O desenvolvimento do trato respiratório próprio é iniciado nesta mesma estrutura. Na superfície basal desta estrutura, entre o quarto par de cavidades faríngeas, o sulco laríngeotraqueal é formado. Este sulco desenvolve-se ventralmente, estendendo-se nessa direção. Este

eventualmente divide-se, criando uma bifurcação que leva à origem da membrana mais interna da laringe, traqueia, brônquios e alvéolos. Estas duas últimas estruturas fazem parte do botão pulmonar. O pulmão é formado mais tardiamente, sendo o seu desenvolvimento iniciado após o estabelecimento do botão pulmonar<sup>34,35</sup>.

### **I.7.1.3 Especificação tecidual**

O tecido da endoderme anterior, cuja diferenciação no trato digestivo superior leva à formação do esófago, estômago, fígado, pâncreas e complexo hepatobiliar, tem a sua diferenciação nestes tecidos causada pela ação de diferentes fatores. Um dos principais fatores que influenciam a diferenciação celular é FGF. A diferente concentração de FGF a que as células podem ser expostas causa a diferente diferenciação destas. A localização onde a expressão de *FGF* é moderada causa a produção de Albumina pelas células precursoras de tecidos hepáticos. Comparativamente, a exposição a baixas concentrações de FGF causa a expressão de *pdx1* que induz a diferenciação de células precursoras de tecido pancreático e da porção inicial do intestino<sup>32</sup>.

Simultaneamente, a exposição a fatores como BMP causa igualmente uma diferenciação da expressão celular, sendo esta correlacionada à concentração a que a célula é exposta<sup>36</sup>. outro fator envolvido no correto desenvolvimento do trato digestivo é o ácido retinóico. No desenvolvimento do trato digestivo, este encontra-se expresso nas extremidades do tubo, onde as cavidades intestinais anterior e posterior se encontram em formação. Este também é importante no correto desenvolvimento de fígado, assim como o estômago e pâncreas.

### **I.7.2 Especificação tecidual do fígado**

Depois das células pertencentes à endoderme se diferenciarem em células do tecido hepático, estas formam a membrana hepática. Esta membrana, que por sinalização continuada de fatores de transcrição, altera-se. Esta altera-se estruturalmente, passando a apresentar-se como um epitélio colunar. Simultaneamente, rearranjos celulares na base deste epitélio causam a transição e instalação de células precursoras de hepatócitos, levando à formação do botão hepático.

Estas alterações, tanto da estrutura epitelial como do estabelecimento das células do botão hepático, são altamente reguladas por fatores de transcrição. Estes fatores, como Hhex, Gata4/6, Hnf6/Onecut1 e Onecut2, assim como BMP, Wnt e HGF, são importantes para a correta localização e expressão celulares. Destes, a continuada expressão de *BMP*, *Wnt* e *HGF*, associada à expressão de fatores de transcrição específicos ao fígado, causam o desenvolvimento mais intenso do botão hepático, assim como da sua diferenciação. Similarmente, os hepatoblastos que durante o seu desenvolvimento se são expostos a uma maior atividade de Notch diferenciam-se em tecidos não hepáticos, mas biliares<sup>32</sup>.

### **I.7.3 Especificação tecidual do pâncreas**

O tecido do qual o pâncreas é originado não apresenta uma só origem. Este órgão é originado por duas vias germinativas diferentes. Estas vias são o botão dorsal e o botão ventral, que são originados em ambos os lados da parte distal do trato digestivo em desenvolvimento. Este é constituído por células de diferentes origens, mas que podem ser separadas pela sua função. Parte das células que perfazem este órgão estão caracteristicamente envolvidas no processo digestivo, sendo células exócrinas que produzem fatores envolvidos na digestão ou células envolvidas na transferência e transporte destes fatores. De igual forma, também há a presença de células cuja função é de regulação hormonal e metabólica. Os botões do qual este órgão é originado estão sujeitos à exposição de diferentes fatores de diferenciação<sup>1</sup>.

O botão ventral, que dará origem às porções ventrais do pâncreas, é originado na região dorsal do trato digestivo em desenvolvimento. O início do desenvolvimento pancreático ocorre pela ação da notocorda que, pelo estabelecimento das zonas de diferente expressão baseadas na intensidade de sinalização realizada por esta, causam a diferente expressão de fatores de diferenciação. Estas diferenças são observáveis através dos mecanismos de desenvolvimento de cada um dos botões germinativos. O botão germinativo ventral tem o seu desenvolvimento despoletado pela ausência local de concentrações elevadas de FGF de origem cardíaca ou venosa. Por contraste, o desenvolvimento do botão germinativo dorsal é influenciado pela presença e ação de fatores de origem venosa<sup>1</sup>.

A origem e desenvolvimento de cada um destes botões embrionários terá consequências no destino que os seus constituintes celulares terão. As células originadas do botão ventral, menos afetado por fatores de crescimento providenciados por tecido mesodérmico que dá origem ao

complexo venoso, possuem maior propensão para se diferenciarem em células acínicas ou ductais, sendo estas responsáveis pela coleta e transporte enzimas e sucos gástricos envolvidos na digestão. As células originadas do botão germinativo dorsal também são capazes de se diferenciar em células acínicas e ductais. No entanto, devido à exposição mais intensa a fatores de origem mesodérmica, como FGF10, há células cuja diferenciação adquire um cariz mais endócrino<sup>1</sup>.

Estes precursores dão por sua vez origem a todas as células endócrinas presentes no pâncreas adulto. A sua diferenciação é fomentada pela presença de neurogenina3, ou Ngn3. Estes progenitores diferenciam-se posteriormente em duas populações celulares diferentes, sendo estas as de progenitores de células  $\beta$  e  $\delta$  e nos progenitores de células  $\alpha$ /PP. As células  $\beta$  e  $\delta$  originadas, assim como os as células  $\alpha$  e  $\gamma$  (também denominadas de células produtoras de polipéptidos pancreáticos ou PP) são as células que irão habitar os ilhéus de Langerhans. A diferenciação destes dois tipos celulares é realizada pela exposição destes progenitores a diferentes fatores. As células que derivam em células  $\beta$  e  $\delta$  são assim ativadas pela expressão de *Pax4*, enquanto as células  $\alpha$  PP são ativadas pela expressão de *Arx*, ou *Aristaless related homeobox*. Os precursores de células  $\beta$  e  $\delta$  derivam nestas células pela expressão de *MafA*. As células que expressam *MafA* diferenciam-se e originam células  $\beta$ , enquanto as que não expressam *MafA* originam células  $\delta$ <sup>1</sup>.

## **I.8 Desenvolvimento da mesoderme**

### **I.8.1 Segmentação embrionária**

A mesoderme embrionária é a camada embrionária da qual todo o esqueleto é originado. É também desta camada que o sistema circulatório, musculatura esquelética e lisa, assim como tecido conector, cartilagem, tecido endócrino, aparelho reprodutor, tecido sanguíneo e os rins são originados. Esta camada germinativa está presente entre a endoderme e ectoderme embrionária e a sua formação ocorre pela migração celular para a zona intermédia do embrião em gastrulação. Quando esta se encontra estabelecida e se dá o início da gastrulação e organogénese, esta mesoderme começa a diferenciar-se ao mesmo tempo que o estabelecimento de outras estruturas ocorre. As duas mais intimamente ligadas a este desenvolvimento é a notocorda e a formação do tubo neural pelo desenvolvimento da ectoderme. Esta mesoderme

irá diferenciar-se de maneira diferente, conforme a sua posição para com a notocorda e o tubo neural. A mesoderme pode ser dividida em: mesoderme paraxial, mesoderme lateral, mesoderme intermédia e mesoderme axial.

A mesoderme paraxial é a mesoderme mais próxima do tubo neural. É através desta mesoderme que os sómitos se irão desenvolver. É também deste tecido mesodérmico que a cabeça embrionária se irá desenvolver.

A mesoderme lateral é a camada da mesoderme responsável pelo desenvolvimento de todo o sistema de aporte de sangue do organismo, sendo através do desenvolvimento deste que vasos sanguíneos, assim como do coração. É desta camada que se irão também desenvolver os ossos que suportam os membros, assim como a pélvis.

A mesoderme intermédia é a camada da mesoderme localizada entre a mesoderme paraxial e lateral e está envolvida no desenvolvimento do rim. Esta também é responsável pelo desenvolvimento das gónadas.

A mesoderme axial é o tecido do qual é originada a notocorda. Esta estrutura, localizada no centro do embrião e que o divide longitudinalmente o embrião, é responsável pela coordenação do desenvolvimento do tecido circundante, tanto estrutural como génica<sup>37</sup>.

### **I.8.1.1 Desenvolvimento da mesoderme paraxial**

A mesoderme paraxial é a camada da mesoderme que é estabelecida em maior proximidade do tubo neural em desenvolvimento. Esta desenvolve-se em sincronia com o tubo neural e está bilateralmente presente a este. O seu desenvolvimento é demarcado pela formação dos agrupados celulares que irão dar origem aos precursores do esqueleto axial, conhecidos como sómitos.

Este tecido, porém, não tem uma igual expressão em toda a sua extensão. A formação de sómitos é controlada por um gradiente de fatores, sendo os mais preponderantes neste tecido os gradientes de BMPs e Noguina. O gradiente é obtido pelo desenvolvimento e deslocação da notocorda, uma vez que esta é incitadora da expressão de *BMPs*. É também é através do estabelecimento deste gradiente, assim como da ação de outros fatores associados ao gradiente, que a mesoderme pré-somítica (MPS) é estabelecida. Destes outros fatores envolvidos na

coordenação do gradiente os que a sua ação é indispensável para o correto estabelecimento da MPS são os fatores Brachyury e TBX6<sup>38,39</sup>.

Outro fator também envolvido na regulação indireta do controle é o fator Mesogenina1, que atua por regulação da expressão de *TBX6*. Esta regulação causa o gradual estabelecimento da correta disposição celular pela exposição dos diferentes estímulos aplicados, levando ao desenvolvimento das estruturas originadas nesta camada

### **I.8.1.2 Sómitogénese**

A sómitogénese é o culminar do gradual estabelecimento da mesoderme paraxial, que ao se estabelecer passa a ser a MPS. Esta mesoderme pré-somítica irá desenvolver-se e levar ao estabelecimento de aglomerados uniformes de células chamados de sómitos. Estes sómitos são originados em intervalos de tempo bem definidos e são desenvolvidos em sincronidade, uma vez que estão sempre presentes em igual número em ambos os lados do embrião e ao longo do eixo antero-posterior.

O número de sómitos que o embrião possui é determinado pela espécie deste e o seu desenvolvimento está associado ao estabelecimento das estruturas axiais da qual o esqueleto se irá formar. A formação destes sómitos também não é apresentada de forma aleatória. O seu estabelecimento organizado pela gradual ativação e repressão de genes que ditam o local de formação de cada sómito. Estes genes são conhecidos como genes *Hox*. O número de genes expressos é diferente entre espécies, sendo no ser humano constituído por trinta e nove genes, e que são atribuídos a cada um dos complexos ao qual estes influenciam. Estes são contados do polo anterior para o polo posterior.

A expressão dos genes *Hox* também não é uniforme, apresentando diferenças na origem da sua expressão. os genes presentes na área mais anterior do plano embrionário apresentam a sua expressão originada no sentido 3', enquanto os genes *Hox* cuja expressão é mais posterior apresentam a sua expressão no sentido 5'. Estes podem ser agrupados em complexos denominados de complexos parálogos – agrupados em que os complexos *Hox* são formados por duplicação cromossomal.



Estes complexos resultam numa expressão gradual, onde a ativação e expressão do gene *Hox* presente no complexo de ação anterior causa a gradual ativação e expressão do gene *Hox* envolvido na regulação e expressão do gene *Hox* presente no complexo seguinte deste.

Esta expressão contínua leva a um desenvolvimento sincronizado com o desenvolvimento gradual da mesoderme pré-somítica, isto é, ao longo do desenvolvimento da MPSa expressão de genes *Hox* deixa já premeditada a área de expressão onde os sómitos se irão formar no final do estabelecimento desta. A este desenvolvimento síncrono é dado o nome de relógio de genes *Hox*<sup>40</sup>. Este relógio é observado no desencadear da ativação génica, onde os quatro primeiros genes *Hox* constituintes do primeiro parálogo são ativados e expressos, seguidos dos aglomerados de *Hox8/9* e *Hox10*. Estes por fim ativam a expressão dos *Hox11* e *Hox12*.

A expressão realizada ao longo do eixo por estes diferentes genes *Hox* não é dinâmica, uma vez que as células diferenciadas que estão localizadas em cada uma das zonas de diferente expressão de *Hox* continuarão a manter uma expressão semelhante à qual as células que as originaram tiveram. Isto permite que continue a haver uma expressão de *Hox*, o que afeta posteriormente o desenvolvimento tecidular. Com o padrão de expressão estabelecido, MPS passa a desenvolver as estruturas que dão origem ao esqueleto axial, denominados de sómitos.

Estes sómitos são originados com o estabelecimento de agrupados de células na mesoderme, denominados de somitómeros. Estes somitómeros são estabelecidos pela interação da população celular da mesoderme com as células que migram e estabelecem-se paralelamente ao tubo neural, também em formação. A sua derivação, de somitómeros para sómitos, ocorre gradual e ciclicamente, começando apicalmente como estabelecimento do primeiro sómito no polo anterior, marcando o local onde a cabeça se irá formar.

#### **I.8.1.2.1 Formação de sómitos**

Como mencionado anteriormente, os sómitos são formados pela partição de agrupados de células presentes na camada da mesoderme, denominados de somitómeros. Estes somitómeros sofrem uma reorganização baseada na especificação tecidular pela ação de reguladores que coordenam a extensão e localização dos somitómeros em transição. No entanto, a origem e a forma como esta coordenação e regulação é realizada ainda é debatida, mas uma das mais aceites hipóteses que explica esta transição é através de mecanismo biomolecular que atua por

periodicidade de expressão de fatores conhecido como relógio de segmentação. Nos vertebrados, a posição espacial e temporal dos sómitos é controlada pela ação de genes como *lunatic fringe (lfng)*, *hairyl/hes1* e *meso1/mesp2* cuja expressão é um dos principais marcadores da posição do sómito<sup>41</sup>.

Outro fator envolvido no estabelecimento de sómitos é o FGF8. Como referido este apresenta um gradiente de expressão, com aumento de intensidade no sentido antero-posterior. A alteração da concentração de FGF8 é um dos coordenadores da formação de sómitos, já que é observado que a concentração elevada de FGF8 causa a manutenção das células num estado mais indiferenciado, enquanto nas áreas onde a sua expressão é mais diminuída a estas sofrem as alterações que leva, à formação de sómitos. A zona de transição entre a manutenção de um estado de maior desorganização celular e o de uma maior organização celular associada à formação de sómitos é denominada de frente de determinação<sup>41</sup>.

A formação dos sómitos é controlada pela ação de genes como *hairyl/hes1* ou *lfng*, cuja expressão é dinâmica e periódica. A sua expressão é controlada pela via que ativa a sua expressão, denominada de Notch. Esta via controla a formação do sómito pela ação inicial de fatores que induzem a sinalização da via. Esta via, após ser ativada, leva à expressão de *hairyl* e *lfng*. Estes dois fatores, envolvidos na diferenciação celular, têm a sua expressão regulada pela ação de fatores externos à célula, mas é principalmente controlada por feedback negativo. É a ação conjunta de todos estes fatores, desde a ativação externa da via Notch, à expressão e feedback negativo da expressão de *hairyl/hes1* e *lfng*, que causa uma expressão periódica em que há a presença destes fatores. Este período entre o início e a cessação da expressão é o período em que se dá a formação de um sómito. O intervalo de tempo presente entre a formação de cada sómito é característico da espécie em que é observado<sup>42</sup>.

### **I.8.2 Desenvolvimento da mesoderme lateral**

A mesoderme lateral, que constitui todo o tecido da mesoderme que envolve a mesoderme paraxial, é a camada da mesoderme que está envolvida no desenvolvimento de todas as estruturas envolvidas no desenvolvimento do sistema circulatório. Este sistema é o primeiro a ser totalmente formado e está envolvido desde os estádios mais precoces do desenvolvimento no transporte de oxigénio e nutrientes necessários para o correto desenvolvimento do organismo cada vez mais complexo, assim como da eliminação dos produtos de excreção

produzidos pelo metabolismo embrionário. O coração é o órgão central envolvido no correto funcionamento deste sistema e é o primeiro órgão funcional a desenvolver-se no organismo. Os outros órgãos e estruturas associados ao sistema circulatório, como vasos sanguíneos e tecido sanguíneo, são formados em simultâneo ao coração, estando funcionais de forma mais precoce do que as restantes estruturas corporais.

### **I.8.2.1 Desenvolvimento cardíaco**

O coração, sendo o órgão central é vital para o estabelecimento do correto funcionamento do sistema circulatório, é um dos primeiros órgãos a ter o seu desenvolvimento total realizado, sendo este alcançado muito antes dos tecidos envolvidos no desenvolvimento de outros órgãos atingirem um estado de desenvolvimento semelhante.

O desenvolvimento deste é iniciado pela diferenciação de células precursoras da mesoderme lateral. Estes precursores são influenciados pela expressão de fatores como *TBX5* que causam uma seleção destes para formar tecido cardíaco. Este fator, associado a fatores de expressão mais local como *BMPs*, *FGF* ou ativadores da via *Wnt*, causa a ativação de cascatas de sinalização internas que levam à ativação de genes envolvidos na formação de sarcómeros, envolvidos no desenvolvimento muscular cardíaco. Isto permite delimitar a localização das células afetadas, levando ao estabelecimento do coração no local correto.

Estas células, devido à reestruturação geral do embrião durante esta fase do desenvolvimento, sofrem de igual forma alterações da sua estrutura que causam o estabelecimento de duas populações de células opostas. É a partir destas populações celulares que por divisão celular e reestruturação se dá a formação do tubo cardíaco. Este tubo cardíaco irá estabelecer-se no centro da região ventral e é constituído por duas camadas distintas de células: uma camada externa, constituída por células que darão origem ao miocárdio; uma cada interna, composta por células de cariz epitelial.

A camada externa é a camada que será responsável pelo desenvolvimento da parte muscular do órgão, enquanto a camada interna é responsável pela correta difusão de fluido para dentro e fora do coração em desenvolvimento. Este começa por desenvolver inicialmente uma câmara com duas entradas, sendo a abertura anterior conhecida como polo arterial e a abertura posterior conhecida por polo venoso. Esta estrutura inicial é também composta por duas regiões com funções distintas.

A primeira região cardíaca é responsável pela formação estrutural de todo o coração, estando ativamente envolvido no estabelecimento de toda a estrutura do órgão, assim como do estabelecimento dos ventrículos cardíacos. No entanto, como a capacidade proliferativa destas células presentes na primeira região cardíaca é limitada, esta atua sobretudo no desenvolvimento do ventrículo esquerdo.

A segunda região cardíaca é estabelecida posteriormente ao estabelecimento da primeira região e as células que a constituem apresentam maior potencial proliferativo. Este aumento da capacidade proliferativa promove a continuação do correto desenvolvimento das restantes partes do coração. A sua contribuição é observada pelo desenvolvimento das restantes estruturas, como a formação das estruturas internas do coração, os átrios deste e a maioria de toda a estrutura do ventrículo direito<sup>1,43</sup>. Estas células também estão envolvidas na formação da base do que será a aorta.

Com o estabelecimento dos precursores celulares que estão envolvidos na formação do coração, é iniciado o processo de formação das estruturas internas deste. Este é coordenado pela diferente expressão de fatores de crescimento e diferenciação. O controlo é realizado pela ação de vias de sinalização BMP e Notch, capazes de realizar uma regulação da expressão de diferentes genes da família *T-box*. Será também a diferente interação entre os genes da família *T-box* que irão causar as diferentes formações estruturais presentes.

### **I.8.2.2 Genes envolvidos da formação cardíaca**

A formação do coração, após o estabelecimento das populações celulares que darão origem a este órgão, são controladas pela ação de vias de BMP e Notch. Estas causam uma expressão dinâmica de fatores da família *T-box*, como apresentado anteriormente. A formação das almofadas cardíacas, que darão origem às válvulas cardíacas, são reguladas pela expressão de fatores de repressão TBX2 e TBX3. Estes dois fatores não só estão envolvidos no desenvolvimento das almofadas cardíacas, como inibem a expressão de fatores envolvidos na formação de cardiomiócitos, levando à sua inexpressão nos átrios auriculares.

Os fatores TBX20 e TBX5 estão envolvidos na restrição da expressão de TBX2 e TBX3 fora da zona de transição auriculoventricular, levando à sua expressão só nessa zona de transição entre câmaras. Os fatores TBX20 e TBX5 também competem com fatores TBX2 e TBX3 pela

interação com fatores envolvidos na miogénese cardíaca, levando a uma padronização gradual da expressão e diferente padronização celular estabelecida. Isto causará a formação das diferentes estruturas, incluindo as fundamentais câmaras ventriculares e auriculares<sup>44</sup>.

#### **I.8.2.2.1 Desenvolvimento do septo cardíaco**

Simultaneamente ao desenvolvimento destas câmaras, dá-se o desenvolvimento inicial do septo que as irá separar. O septo é formado pela fusão de diferentes tecidos iniciais envolvidos na predeterminação da zona em formação. Estas partes provêm da delimitação daquilo que serão os ventrículos, aurículas e átrios coronários. Este é inicialmente formado durante o estabelecimento das câmaras coronárias, aquando da reorganização da segunda região coronária.

Este é constituído por duas partes, sendo elas de cariz muscular e membranar, onde o septo de cariz membranar está envolvido no estabelecimento daquilo que será a zona de transição entre as cavidades auriculares e ventriculares. Esta zona, apesar de ter uma grande presença de células de origem cardiomiocítica, apresenta também uma população de células originadas na crista neural, que migram para e se estabelecem ao longo do septo. Estas células são as progenitoras das células de Purkinje que irão coordenar as contrações cardíacas do coração desenvolvido<sup>43</sup>. Com o estabelecimento das câmaras coronárias, o septo é estabelecido e passa a separar parcialmente o fluxo sanguíneo entre estas, sendo só a sua separação total após o nascimento do organismo.

#### **I.8.2.3 Desenvolvimento do sistema vascular**

O sistema vascular é o sistema composto por toda a rede de vasos capacitados de aporte de sangue e cuja função é a de facilitar a distribuição de nutrientes, oxigénio ou fatores hormonais, necessários à manutenção do correto funcionamento do organismo, assim como a excreção de produtos resultantes da atividade celular. Este sistema, em conjunto com a atividade cardíaca, é responsável pelo correto desenvolvimento do embrião, uma vez que facilita a difusão e excreção de produtos deste organismo cada vez mais complexo.

O seu desenvolvimento, tal como o coração, é dos primeiros a ocorrer, ocorrendo em simultâneo com o aparecimento dos primeiros precursores coronários. A origem dos precursores das células que farão parte dos vasos é, tal como as células precursoras de tecidos envolvidos na génese cardíaca, a mesoderme lateral. Estas células, através de especialização causada pelos gradientes previamente estabelecidos, irão desenvolver-se em duas linhagens distintas.

A distinção apresentada pela diferenciação destas células é causada por inibição mútua dos fatores a que estas estão expostas. As duas linhagens darão origem as células progenitoras de músculo liso, presente nas posteriores paredes dos vasos formados, e hemangioblastos, que darão origem aos progenitores de células hematopoiéticas<sup>45</sup>. A sua diferenciação distinta é causada pela diferente exposição a fatores que determinam qual origem celular irão formar. Nesse sentido, a formação de células precursoras de progenitores hematopoiéticos e de células progenitoras de músculo liso são alcançadas pela atividade de Notch a que estas células são expostas.

A via Notch, assim como as vias de BMP e Wnt, é responsável pela diferenciação em células de cariz muscular. No entanto, quando a sinalização por esta via é menos intensa, as células progenitoras estabelecidas durante o estabelecimento da mesoderme irão diferenciar-se de maneira diferente, passando a expressar fatores que darão origem a progenitores hematopoiéticos. Esta diferença causada pela maior ou menor exposição a Notch é causada pelos fatores que ambas linhas celulares passam a expressar.

A exposição a uma maior atividade de Notch causa a continuação da expressão celular de *dHand* (marcador de inespecificidade celular presente nos precursores de ambas as linhas) causa a eventual diferenciação celular para células progenitoras de músculo liso. Contrariamente às células cuja exposição a Notch é elevada, as células em que a exposição a *Notch* é diminuída sofrem alterações na sua expressão. A maior diferença na expressão é a alteração da expressão celular de *dHand*, que deixa de ser expresso e no seu lugar passa a haver uma maior expressão de *Scl*. Como a expressão de *dHand* e *Scl* é mutuamente inibitória, irão causar um gradual estabelecimento das zonas onde cada um destes marcadores irá atuar<sup>46</sup>.

Depois de estabelecidas as duas populações celulares, as células que darão origem a progenitores hematopoiéticos irão igualmente subdividir-se em ambos tipos de células hematopoiéticas ou células progenitoras de endotélio vascular.

### **I.8.2.3.1 Desenvolvimento vascular**

Com o estabelecimento da linha germinativa envolvida no estabelecimento estrutural dos vasos sanguíneos, é iniciada a sua formação. Esta é caracterizada por alterações na morfologia celular, onde as células de cariz endotelial vascular e as células de músculo liso interagem e levam à formação do vaso. Estas alterações são iniciadas com a formação das células endoteliais. Estas células, inicialmente encontradas num estado desorganizado, começam a agrupar-se a formar o lúmen da rede de vasos sanguíneos em formação. Este processo de formação da rede vascular não necessita de ação cardíaca para ser realizada, sendo esta só posteriormente necessária para a especificação do vaso como arterial ou venoso. Este processo de vascularização termina com a correta irrigação de todos os tecidos embrionários pela via vascular<sup>45</sup>.

### **I.8.2.3.2 Desenvolvimento do tecido sanguíneo**

Simultaneamente à formação do tecido cardíaco, assim como do estabelecimento e expansão da rede venosa, dá-se o estabelecimento de populações celulares envolvidas na produção de células constituintes do tecido sanguíneo. Estas populações de células progenitoras de células sanguíneas são igualmente formadas pela diferenciação de hemangioblastos, mas em células hematopoiéticas.

Na formação de células com capacidade hematopoiética, estes precursores iniciam uma migração celular, em que durante dada migração tendem a aglomerar-se. A sucessiva aglomeração destas células causará o estabelecimento de uma ilha de produção sanguínea. Dependendo do estímulo a que uma célula desta população seja exposta, esta pode diferenciar-se em duas linhagens distintas: uma linhagem de células hematopoiéticas totalmente estabelecida, cuja sua única função é a de produzir eritrócitos; e uma linhagem de células endoteliais, responsável pela formação dos vasos sanguíneos. Esta seleção de destinos celulares a que as células suscetíveis são expostas é causada pela expressão de genes envolvidos na formação de hemoglobina que ditam o seu destino celular<sup>47</sup>.

Com o estabelecimento de uma rede vascular, as células originadas por estas células hematopoiéticas serão transportadas por via do sistema circulatório já funcional, contribuindo para o seu correto funcionamento.

### **I.8.3 Desenvolvimento da mesoderme intermédia**

A mesoderme intermédia é a porção da mesoderme confinada entre a mesoderme paraxial e lateral e é responsável pela formação do rim. esta porção, apesar de não ter o seu desenvolvimento não dependente da ação direta de outras porções da mesoderme, é fortemente influenciada pela expressão apresentada pela mesoderme paraxial. Esta tem a sua regulação de expressão base estabelecida pelo gradiente de BMP que, em coordenação direta com a sinalização realizada no contexto do desenvolvimento da mesoderme paraxial, causam o correto ativar do desenvolvimento e diferenciação dos percursos celulares que darão origem aos constituintes do rim.

Nos vertebrados, o rim tem a sua génese na população de células presente entre a mesoderme somítica e mesoderme lateral do embrião. Durante este período em que se estão a formar os sómitos, a conjugação de fatores de expressão presentes em ambas porções leva ao estabelecimento da expressão de fatores de transcrição *Pax2*, *Pax8*, *Lhx1* (também conhecido como *Lim1*), assim como dos fatores *Osr1* e *Gata3*<sup>48</sup>.

A ação destes fatores induz as células presentes nesta camada a diferenciarem-se, a diferenciação é iniciada pela expressão de *Pax2* e *Pax8*, que induz a diferenciação inicial destas células em células pronéfricas. Estas células, precursoras das células dos ductos nefríticos, são incapazes de realizar função renal em estadios mais precoces de desenvolvimento. Durante esta etapa de diferenciação, *Lhx1* é ativado e a sua ação induz a diferenciação das células pronéfricas, convertendo-as em células do ducto nefrítico<sup>49</sup>. Estas células pertencentes ao epitélio do ducto nefrítico, assim como do restante tecido que dará origem aos outros componentes do rim, denominado de cordão nefrogénico.

### **I.8.3.1 Formação do rim – Pronefrínio**

Com a formação da origem tecidular do ducto nefrítico, este inicia o seu desenvolvimento. A expansão deste é realizado pela expansão da extremidade caudal, onde está presente uma frente de células progenitoras com capacidade migratória. Em contraste, as células deste ducto localizadas mais no sentido rostral perdem essa capacidade migratória, estabelecendo-se localmente.

Durante esta proliferação, a expressão de fatores de transcrição também se apresenta dinâmica. As células da frente de proliferação, com maior capacidade migratória, *Gata3* está envolvido



no estabelecimento da capacidade migratória celular, sendo a sua expressão responsável por dita capacidade migratória, como a manutenção de um estadió de indiferenciação mais prolongado. Simultaneamente, a expressão de *Lhx1* está envolvida no alongamento caudal do ducto. Estes dois fatores interagem entre si, causando um feedback positivo que mantém uma expressão mútua de ambos na extremidade caudal do tecido<sup>48</sup>.

A transição celular durante a formação do ducto nefrítico, da frente caudal mais expansiva para a frente rostral mais estabelecida, é conseguida pela expressão de *Osr1*. Este fator tem um gradiente de expressão em que apresenta maior intensidade no sentido rosto-caudal. É observado que as células da mesoderme intermédia, mais aproximadamente estabelecida no lado rostral, apresentam uma maior expressão de *Osr1*. A expressão de *Osr1* diminui, quanto mais próximo a população celular se encontra do polo caudal, sendo gradualmente substituída pela expressão de genes *T-box*<sup>48</sup>. O término da expansão do ducto renal é o evento em que se a transição do estadió inicial do desenvolvimento renal intermédio.

### **I.8.3.2 Formação do rim – Mesonefrínio**

O desenvolvimento do ducto nefrítico, da qual o rim será originado, causa a ativação de fatores de transcrição que causam uma alteração de tecidos adjacentes a este. Um dos fatores ativados, *Wnt9b*, é um fator cuja ação causa o estabelecimento de estruturas nefríticas mais estabelecidas, denominadas de túbulos mesonefríticos. A génese destes túbulos é coordenada em simultâneo pela ação direta das células do ducto, assim como da ação indireta da mesoderme somítica, que ajuda a coordenar a disposição na qual estes túbulos se irão encontrar. O seu desenvolvimento também está dependente da sua localização.

Túbulos que se localizem na porção mais rostral são influenciados pela presença de fatores de transcrição, como Wilms Tumor protein 1 (*Wt1*) e Homeobox protein Six1 (*Six1*). Estes fatores, em conjugação com os fatores associados à posição distal do tecido em desenvolvimento, causam a fusão dos túbulos nefríticos ao ducto nefrítico central, que ocorre de forma gradual no plano rosto-caudal. A fusão gradual destes microtúbulos não será, no entanto, completa, uma vez que está associada ao estado de desenvolvimento do ducto nefrítico central.

Quando o ducto nefrítico termina o seu desenvolvimento, os túbulos presentes no plano mais caudal não se irão conectar e serão gradualmente degenerados. Diferencialmente, num embrião

feminino este ducto e túbulos associados fazem parte de um sistema separado do sistema reprodutor, enquanto em embriões masculinos estes irão se associar ao sistema reprodutor em desenvolvimento<sup>48,50</sup>.

### **I.8.3.3 Formação do rim – metanefrínio**

Com o estabelecimento daquilo que é a estrutura central do rim, este começa a diferenciar-se em tecidos mais especializados que estarão presentes no órgão quando totalmente formado. A estrutura já presente, composta pelo ducto nefrítico e todos os túbulos associados, sofre alterações estruturais. Estas alterações estruturais serão responsáveis pelo desenvolvimento dos ureteres.

Estas alterações são induzidas pela atividade das populações de células estaminais de tecido nefrítico presentes. Estas células estaminais serão importantes no desenvolvimento completo do rim, uma vez que estão envolvidas na formação de ureteres, a associação destes ao sistema nefrítico central e no estabelecimento das populações de nefrónios associadas.

### **I.8.3.4 Formação do botão uretérico**

O botão uretérico é formado durante a partir de populações de células estaminais presentes na mesoderme intermédia localizadas no mesmo plano do local de formação do botão membranar. Esta população celular, com características diferentes das apresentadas pela população celular constituinte do mesonefrínio, sofrem uma migração e estabelecem-se lateralmente aos túbulos nefrídios formados, levando ao estabelecimento das futuras populações de células que darão origem aos nefrónios presentes. Esta população também está envolvida na coordenação da sinalização para a formação do botão uretérico.

A formação do botão uretérico ocorre pela presença de fatores de sinalização Gdnf (glial-derived neurotrophic factor) e FGF10 que, ao interagirem com recetores presentes nas células do ducto nefrítico central, causam o crescimento de um aglomerado de células que dará origem ao botão uretérico.

Com o desenvolvimento do tecido originado do botão, o tecido mesenquimal estabelecido começará por se condensar ao redor deste, permitindo o estabelecimento dos progenitores celulares na posição adequada. Destes progenitores, os que darão origem a nefrônios irão estabelecer-se adjacientemente ao epitélio celular em desenvolvimento, enquanto as células que formarão a camada intersticial irão estabelecer-se em associação a estes precursores nefróticos<sup>51</sup>.

É através desta interação entre as células presentes no botão urético e as células que através do desenvolvimento deste se estabelecem ao longo da estrutura formada que se dá o estabelecimento da rede de canais que irá conectar-se às estruturas nefróticas em desenvolvimento<sup>51</sup>. Aos locais onde o estabelecimento das células nefróticas ocorrerá dá-se o nome de cápsulas de Bowman. Será nestas cápsulas e no ducto nefrótico associado que se dará a filtração e regulação realizada a nível renal, assim como a sua coleta para posterior excreção. A etapa final do desenvolvimento renal ocorre pelo aumento da complexidade deste sistema, culminando na formação do órgão caracteristicamente conhecido.

#### **I.8.4 Desenvolvimento da mesoderme axial**

A mesoderme axial é a porção da mesoderme localizada no centro do embrião em desenvolvimento, estando abaixo do local de formação da crista neural e com as porções da mesoderme intermediária, lateral e paraxial nas suas laterais. Esta porção da mesoderme está envolvida no desenvolvimento da notocorda, que é o centro de toda a regulação de expressão e estabelecimento de gradientes que coordenam a expressão de todos os fatores envolvidos no correto estabelecimento das três camadas germinativas.

Contrariamente ao apresentado noutros tipos de linhagens celulares, a existência desta população celular é transiente, existindo como indutor principal para o desenvolvimento da crista neural e o estabelecimento dos padrões anteriormente descritos. Esta população de células tem a peculiaridade de apresentarem vesículas com elevada pressão hidrostática, o que causa a criação por parte destas células de uma estrutura sólida na qual as restantes estruturas podem desenvolver-se. Com o desenvolvimento do embrião e a criação de estruturas mais complexas, a maioria das células presentes na notocorda sofrem apoptose e são eliminadas, mas uma pequena porção destas subsiste e darão origem ao núcleo esponjoso dos discos intervertebrais<sup>1</sup>.

#### **I.8.4.1 Formação da notocorda**

A notocorda é um tecido cuja origem está no organizador dorsal, presente no embrião durante as fases iniciais da gastrulação. Durante os estádios iniciais da gastrulação, este organizador dorsal sofre alterações que culminam na formação da estrutura inicial do processo de desenvolvimento da notocorda, denominado como cordomesoderme.

Esta cordomesoderme faz parte do tecido mesodérmico, mas sofre alterações na expressão e morfologia que a permitem distinguir-se mais cedo do restante tecido. As alterações sofridas por esta população de células causam uma alteração da disposição celular, havendo uma maior intercalação entre si, assim como uma convergência neste ponto central do eixo dorsal. Este aglomerado de células irá estabelecer uma linha contínua em que toda a notocorda será formada. Com estabelecimento desta população, assim como com o desenvolvimento geral do embrião, estas células são alteradas, adquirindo uma densa matriz extracelular, assim como um maior volume intracelular. Estas diferentes alterações causam o estabelecimento de uma estrutura celular rígida, que culmina na formação de uma estrutura tridimensional cilíndrica que permite a correta disposição estrutural do embrião<sup>52</sup>. No entanto, este processo não é direto, mas sim ocorrendo por fases. Como indicado anteriormente, a notocorda tem a sua origem na aglomeração celular na linha central do embrião, estendendo-se desde o polo rostral e acompanhando o desenvolvimento até ao limiar da zona proliferativa caudal, onde ainda ocorre a gastrulação e por consequência a notocorda está em desenvolvimento.

À estrutura transitiva entre o aglomerado menos organizado e o aglomerado estruturalmente organizado destas células dá-se o nome de placa da notocorda. Ao formar-se, esta placa começa por adquirir uma forma côncava, adequando-se à estrutura do tubo neural que se formará em conexão a esta. Em estádios de desenvolvimento mais tardio, a placa continua a desenvolver a sua concavidade, penetrando cada vez mais na camada ventral. Através desta forma, a placa da notocorda adquire a forma de parábola invertida. Isto implica que inicialmente a placa desenvolve-se como uma estrutura de suporte do tubo neural, com uma forma que se adequa à sua morfologia, mas que posteriormente desenvolve-se e adquire uma forma correspondentemente inversa<sup>53</sup>.

Em estádios de desenvolvimento mais avançado, esta placa da notocorda continua a desenvolver-se, sendo as suas extremidades o ponto da extensão. Estas extremidades, ao

desenvolver-se, irão ser expostas às mesmas forças que exercem o efeito que dá a curvatura à restante estrutura. Esta curvatura culminará no eventual contacto entre as extremidades que, quando ocorrer, marcará a transição para o estabelecimento da notocorda definitiva. Quando formada a notocorda definitiva, esta irá desagregar-se da camada germinativa da endoderme e estabelecer-se totalmente em associação com a mesoderme.

O único ponto de associação que a notocorda manterá com as outras camadas germinativas que não a mesoderme será só com o tubo neural. Esta só apresenta discrepâncias nos polos rostral e caudal, sendo que no polo rostral não há a formação da notocorda definitiva, mantendo-se a placa da notocorda, enquanto no polo caudal esta apresenta um diâmetro maior e com uma população de células do que o apresentado no restante embrião. No polo rostral, esta também apresenta a particularidade de não se apresentar associada ao tubo neural<sup>52,53</sup>.

### **I.8.5 Desenvolvimento da ectoderme**

A ectoderme é a camada germinativa que se estabelece na camada mais superficial dos três tecidos germinativos que se desenvolvem durante a gastrulação. É através do desenvolvimento desta camada que o sistema nervoso, assim como a pele, são formados. O seu desenvolvimento ocorre simultaneamente ao das outras linhas germinativas, sendo que a ectoderme inicia o seu desenvolvimento pela formação da placa neural, que dará origem ao tubo neural.

#### **I.8.4.3 Estabelecimento da placa neural**

A placa neural é todo o tecido originado pelo desenvolvimento da ectoderme, após a gastrulação. Esta engloba todos os tecidos associados ao sistema nervoso em desenvolvimento, tanto com função direta neste, como no correto desenvolvimento e atividade. Esta placa neural apresenta duas zonas de expressão diferente, com a expressão de fatores associados ao desenvolvimento neuronal mais presente na zona central da ectoderme em desenvolvimento e a expressão de fatores envolvidos na formação da pele.

Estas células precursoras que estão na origem da pele localizam-se mais lateralmente, delimitando a extensão total da placa. Destes dois subtipos de células presentes na placa neural, as células presentes mais internamente e com a expressão de fatores associados a neurónios

também apresentam uma sub-expressão que as diferencia, sendo que darão origem a quatro tipos de células neuronais: progenitores neuronais, células da crista neural, precursores de células pigmentares e células envolvidas na formação óssea e cartilaginosa da face e precursores celulares que darão origem a todos os órgãos sensoriais presentes na cabeça do organismo <sup>54</sup>.

O estabelecimento da placa ocorre ainda durante o processo de alongamento do embrião observado na gastrulação. Durante este período de desenvolvimento, o tecido que dará origem a esta estrutura sofre a influência de fatores que causarão a ativação de marcadores específicos para células do tipo neural. Um dos mais importantes fatores envolvidos na ativação de marcadores indutores de destino neural é *Sox2*<sup>55</sup>. Enquanto a expressão de *Sox2* causa a ativação de destinos neuronais, outros genes envolvidos na especificação de destinos celulares não neuronais na ectoderme está também em curso. Em ambos os casos, a localização da expressão inicial dos fatores determinantes é causada pelo controle exercido pelo gradiente de *FGF* e *BMP*, envolvidos na formação dos eixos embrionários<sup>54</sup>. A expressão mais proeminente de *BMP* é responsável pela indução de tecidos germinativos não neuronais, enquanto a indução por *FGF* causa a diferenciação em tecido neuronal<sup>56</sup>.

Esta diferença de expressão causa o início do desenvolvimento das diferentes estruturas de cariz neuronal, que coincidem com o desenvolvimento das outras estruturas iniciais do embrião.

#### **I.8.4.4 Desenvolvimento do tubo neural**

O tubo neural é a estrutura da qual o sistema nervoso central se irá desenvolver. A formação deste é regulado pela presença de marcadores específicos como genes da família *Sox*, e apresentam uma ausência da expressão de fatores envolvidos no desenvolvimento de outros tecidos da ectoderme. Esta camada inicial de células irá sofrer alterações morfológicas que causarão a sua invaginação e o estabelecimento destas sob a forma de uma estrutura tubular.

Esta ocorre de diferentes formas, sendo a sua formação correlacionada com o local em que é formada. Este desenvolvimento ocorre de duas formas diferentes, sendo estas por neurulação primária e secundária<sup>57</sup>. A neurulação primária é encontrada no polo rostral e a neurulação secundária ocorre no polo oposto, no polo caudal. Estes dois tipos de neurulação têm também uma zona de transição onde nenhum dos tipos de neurulação prevalece, tendo esta características de ambos na zona onde é expressa.

#### **I.8.4.5 Neurulação primária**

A neurulação primária é a forma pela qual a placa neural se desenvolve em tubo neural na zona mais próxima do polo rostral. Esta ocorre por alterações morfológicas da placa, onde esta forma o tubo através de enrolamentos e dobras da placa. Esta é iniciada pela movimentação celular no polo rostral, onde as células que delimitam a placa sofrem alterações e aumentam a sua extensão. Este aumento de extensão causará a formação do sulco neural. O sulco neural irá dividir o embrião, sendo que cada uma das paredes do sulco se irá estender para o centro, onde eventualmente se irão fundir e formar o tubo.

O estabelecimento do sulco ocorre pela expansão das paredes deste, assim como da gradual formação do sulco. Este é formado pelo dobramento das células localizadas no centro da placa e que formam o ponto médio da dobra<sup>58</sup>. As células presentes neste ponto irão manter um contacto próximo com a notocorda também em formação e irão desenvolver-se em simultâneo com a mesma.

Nas regiões mais anteriores ao ponto médio da dobra em ativa formação, a fossa neural continua a desenvolver-se ativamente, com a continuada expansão das paredes. Estas, por ação mecânica, começam a aproximar-se e a cobrir a fossa. Esta ação mecânica é causada pelo estabelecimento de dois pontos de ancoragem intermédios, que irão auxiliar a membrana e permitir que esta comece a dobrar em direção ao centro. Estes pontos de ancoragem possuem células epiteliais cuja forma é diferente da apresentada pelas restantes células, sendo mais constrictas, o que torna a estrutura capaz de formar dobras.

Estruturalmente, estas células são semelhantes às presentes na base do ponto médio da fossa e tal como essas as células presentes nas dobras laterais as suas alterações estruturais são incutidas pela ação da notocorda. Esta notocorda influencia a forma destas células através da ação de fatores de transcrição, sendo as células presentes na base do fosso (estabelecidas sob a forma do ponto médio) influenciadas sobretudo pela ação de Sonic Hedgehog (SHH), enquanto as células presentes na dobra lateral são influenciadas pelo gradiente de SHH e BMP<sup>59</sup>.

Estes fatores promovem a remodelação do citoesqueleto celular, afetando a sua forma. Esta alteração de forma não é uniforme, ocorrendo gradualmente. Nos locais mais anteriores, a membrana começa a expandir até contactar com a membrana do lado oposto. Em mamíferos, o

tubo neural é formado em simultâneo em diferentes pontos do embrião, mas apresentando-se sempre como uma união continuada das paredes. Quando totalmente encerrado, o tubo neural irá adquirir uma forma cilíndrica de estrutura rígida que se irá desagregar do epitélio da endoderme, mas que manterá uma forte associação à notocorda.

#### **I.8.4.6 Neurulação secundária**

A neurulação secundária é a forma de neurulação mais comumente encontrada no polo caudal do embrião em desenvolvimento. Contrariamente à neurulação primária, a neurulação secundária é originada pela expansão gradual de células da ectoderme localizada no polo caudal, que promovem a formação do tubo neural não por cavitação e formação direta deste, mas pelo processo de formação da estrutura e o seu posterior refinamento.

No polo caudal, a frente da notocorda causa a diferenciação celular dos precursores da ectoderme, causando o estabelecimento de um aglomerado celular não uniforme. Este aglomerado celular sofre gradualmente uma condensação, causando levando a uma maior agregação celular. Gradualmente, estas células indiferenciadas começam a sofrer alterações morfológicas.

As células localizadas mais no exterior começam a expressar um fenótipo mais epitelial, enquanto as células localizadas mais no interior não são imediatamente afetadas. Estas irão sim adquirir gradualmente um fenótipo mais cilíndrico e uniforme, denominado de cordão medular. Simultaneamente à formação deste cordão, na extremidade caudal, dá-se a formação da dobra cordoneural, que é a estrutura resultante da fusão do botão germinativo caudal, da notocorda e da extremidade caudal do tubo neural em formação.

Após formado, o cordão medular sofre alterações morfológicas, constituídas pela formação de dois lúmenes no interior desta. Estes dois lúmenes eventualmente irão unificar-se, criando um só lúmen contínuo. Com a fusão dos dois lúmenes num só, o tubo neural fica estruturalmente semelhante ao apresentado na neurulação primária<sup>60</sup>.

#### **I.8.4.6 Neurulação juncional**



A neurulação juncional é o processo de neurulação intermediário, uma vez que apresenta característica no seu desenvolvimento semelhantes a ambos métodos de neurulação primário e secundário. Este ocorre na zona de transição, interligando as zonas em que cada uma está presente. Sendo uma região de transição em que as características de ambos estão presentes, as células neuronais presentes vão apresentar um desenvolvimento do tubo por expansão e alongamento do tubo, assim como da formação deste com a organização do cordão medular. A zona em que cada um será expresso é, no entanto, diferenciada.

As células caracteristicamente encontradas na neurulação primária vão desenvolver-se apicalmente, sendo responsáveis pela formação apical do tubo neural. Em contraste, as populações presentes no método de neurulação secundário são mais encontradas na superfície basal, desenvolvendo-se em maior contacto com a notocorda<sup>57</sup>.

Após a gastrulação e a formação dos tipos celulares derivados das três camadas germinativas, os órgãos originados pela diferenciação e correto estabelecimento destas populações celulares vão continuar a desenvolver-se e dar origem ao que são os constituintes de um indivíduo adulto.

### **I.9 Desenvolvimento de *Drosophila melanogaster***

A *Drosophila melanogaster* é um dos modelos animais mais usados atualmente para o estudo da embriogénese animal. Este organismo apresenta diversas vantagens para este estudo, pois para além das diferentes ferramentas que permitem diferentes manipulações genéticas é animal ovíparo, pelo que o embrião se desenvolve num ovo depositado externamente à progenitora, o que permite um acesso mais facilitado ao embrião. Este organismo apresenta igualmente a particularidade de diariamente depositar uma elevada quantidade de ovos, expandindo assim a quantidade de embriões a ser estudados<sup>61</sup>.

Como modelo animal, a *D. melanogaster* apresenta um ciclo de vida com quatro etapas importantes de desenvolvimento: fase embrionária, fase larvar, pupa e fase adulta. Estas quatro fases de desenvolvimento ocorrem num curto espaço de tempo, uma vez que a esperança média de vida deste animal é entre 80 e 100 dias<sup>62</sup>.

Uma vez que o ciclo de vida deste animal é curto e o acesso ao embrião é facilmente alcançado, uma das áreas de maior impacto onde é utilizado é no estudo da embriogénese

## **I.9.1 Embriogénese em *Drosophila melanogaster***

### **I.9.1.1 Desenvolvimento pré-fecundação**

Em *D. melanogaster*, a embriogénese engloba todos os acontecimentos desde a fecundação até ao final da gastrulação e é em parte semelhante à apresentada por outros organismos multicelulares, sendo caracterizada por uma rápida multiplicação nuclear e um constante controlo da expressão génica. Em *D. melanogaster*, o período de desenvolvimento embrionário inicial abrange o período entre a deposição e fertilização do ovo e o início da segmentação<sup>63</sup>.

Neste organismo, a embriogénese inicia-se antes da deposição do ovo, quando este ainda se encontra confinado no trato reprodutor. O ovo não fertilizado, que se encontra parado em metáfase I, é retido até se apresentarem as condições ideais para a sua deposição.

Estas podem ser pelo acasalamento da fêmea ou quando se apresenta uma pressão biológica ou ambiental para tal ser realizado. Destas situações, só se ocorrer um acasalamento bem sucedido é que se dá uma correta fecundação e ativação do ovo.

Quando o estímulo provocado pelo acasalamento é dado, o ovo começa a sua deslocação pelo oviduto. Durante o seu deslocamento, este vai sofrer alterações que permitirão o correto desenvolvimento deste quando fecundado, assim como serão feitas salvaguardas que irão impedir que este o mesmo sofra poliespermia<sup>64</sup>.

Com o início da movimentação do ovo não fecundado, uma das alterações apresentadas é a reativação do ciclo celular do oócito, que culminará na formação de uma célula haploide capacitada de interagir com o pronúcleo de espermatozoide, também haploide. Como o apresentado por outros organismos multicelulares com capacidade reprodutiva, isto é realizado com o intuito de formar uma célula com a correta proporção genómica.

### **I.9.1.2 Desenvolvimento pós-fecundação**

Com o avançar do ciclo celular para estadios posteriores a metáfase I, começa a ser observada tradução de RNA materno, assim como há também rearranjos estruturais presentes no ovócito. É durante transferência do ovo, do ovário para o útero, que ocorre a fecundação.

No entanto, contrariamente ao observado em outros animais, a fecundação não é a responsável pela ativação do embrião. Isto é devido à ativação ocorrer posteriormente por via de fatores de stress mecânico. Este stress mecânico é causado pelo aumento da pressão externa, causado pelo movimento do ovo em constante contacto com as membranas do ducto reprodutor. As paredes do ducto apresentam uma concentração elevada de cálcio, que devido à pressão causada pelas paredes levam à entrada de cálcio no ovo por via de canais iónicos mecanossensíveis<sup>65</sup>. Como noutros organismos, entrada de cálcio externo no embrião causa uma cascata de ativação membranar, tornando-a impermeável à entrada de espermatozoides extra.

De forma igual ao como a impermeabilização ocorre pela expansão da onda de cálcio presente no ponto de ativação, a entrada de cálcio causa a libertação de reservas internas de cálcio, o que causa uma propagação ondular em todo o embrião, capaz de também ativar a expressão génica do embrião<sup>64</sup>. Durante as horas seguintes, o embrião irá começar o seu desenvolvimento<sup>63</sup>.

Logo após a fertilização e ativação bem-sucedida do embrião, este começa a dividir-se. Porventura, estas divisões não são como as observadas noutros organismos, já que a divisão é somente nuclear. Ao ser somente nuclear, o embrião irá, num estadio inicial, ter todos os núcleos mitóticos presentes num só citoplasma celular. Estas divisões mitóticas que inicialmente ocorrem a cada 10 minutos, acontecem no plano central do embrião e permanecem síncronas da primeira à décima terceira divisão<sup>66</sup>.

Com o aumento do número de núcleos presentes após a quarta divisão mitótica dá-se a expansão destes para a região mais posterior do embrião. Quando este perfaz oito divisões mitóticas síncronas, dá-se a migração nuclear para a superfície da membrana e o estabelecimento de um agrupado de núcleos que darão origem a células polares no polo posterior do embrião<sup>67</sup>. É também a partir desta fase que começa a observar-se a expressão de fatores envolvidos na especificação axial embrionária, sendo primeira observada a especificação axial antero-posterior controlada pelos fatores *Bicoid-Nanos*<sup>68</sup>.

Com a realização da décima divisão nuclear, a migração nuclear cessa, estando todos os núcleos presentes na superfície do embrião. É também a partir deste ciclo que a expressão de genes *gap* e posteriormente genes *pair-rule* começa a ser detetável<sup>69</sup>. Apesar de continuar a realizar divisões síncronas, todas as divisões nucleares posteriormente realizadas pelo embrião começam a apresentar um intervalo maior entre cada divisão nuclear.

De forma gradual, é entre o décimo e o décimo terceiro ciclo de replicação que a transição entre o controlo génico por via de RNA materno para controlo génico por via autónoma ao embrião

é estabelecida<sup>70</sup>. Com todas as alterações que embrião sofreu entre o início da divisão nuclear até ao final dos ciclos mitóticos síncronos, o embrião passa a ser denominado de blastoderme sincicial. É na fase final do período de divisão nuclear livre, entre o décimo terceiro e o décimo quarto ciclos, que a celularização é iniciada<sup>71</sup>. É também durante este período que a expressão de genes *pair-rule* já é mais predominante, com uma localização já definida e sob a forma de stock de tamanho e posição corretas<sup>72</sup>.

Na última divisão mitótica, o processo de celularização é terminado. É por via deste processo que os núcleos, presentes na superfície da membrana, são gradualmente invaginados e individualizados, formando posteriormente uma monocamada de células que cobrem a superfície do embrião<sup>71</sup>.

Este processo marca a transição entre a fase do embrião sincicial e a gastrulação.

### **I.9.1.3 Estabelecimento dos eixos embrionários por ação de genes maternos**

O estabelecimento dos eixos, em *D. melanogaster*, é um processo que apesar de ser realizado durante o desenvolvimento embrionário, tem a sua génese ainda a formação do oócito. Durante o desenvolvimento do oócito, este é sujeito à ação das células de suporte que lhe fornece reservas nutricionais e RNA. Destes RNAs, os principais para o estabelecimento dos eixos são RNA mensageiro (mRNA) de *Bicoid*, *Hunchback*, *Nanos*, *caudal*, *oskar*, *Toll*, *Dorsal* e *Gurken*<sup>73</sup>.

### **I.9.1.4 Estabelecimento dos fatores envolvidos no eixo antero-posterior**

Como referido, contrariamente ao observado em animais vertebrados, o estabelecimento inicial dos componentes que fazem parte do eixo antero-posterior em *D. melanogaster* ocorre durante o desenvolvimento do oócito, antes da fertilização deste. Neste organismo, é criado durante a oogénese um gradiente inicial de mRNAs indispensáveis para o estabelecimento deste eixo antero-posterior. Os mRNAs mais importantes para o estabelecimento deste eixo são *Bicoid*, *Gurken* e *oskar*.

### Expressão de *Bicoid*

A expressão de *Bicoid* é obtida através da tradução de mRNA presente no embrião. Este mRNA é depositado no oócito durante a fase de maturação<sup>74</sup>. A localização do mRNA não é estática. Inicialmente, quando o mRNA ainda está a ser transferido para o oócito, a sua disposição é uniforme, só adquirindo a sua disposição no embrião após a sua transferência para o polo anterior. Esta transferência só é conseguida pela ação de outro interveniente no estabelecimento dos eixos, sendo esta realizada pela ação de *Gurken*. Após ser localizado no polo anterior, este começa a ser traduzido durante o sétimo ciclo de replicação nuclear, aumentando o ritmo nos ciclos seguintes<sup>68</sup>.

### Expressão de *Gurken*

*Gurken* é um fator cujo papel no estabelecimento dos eixos embrionários não é pela sua ação direta no controlo de expressão posterior, mas sim pelo seu controlo nos estádios mais precoces da transferência de mRNA para a posição adequada deste. Isto é conseguido pela ação realizada por *Gurken*. A expressão de *Gurken* é responsável pela ativação de *Torpedo*, o recetor deste presente nas células foliculares que estão associadas ao oócito em formação. Ao ativar *Torpedo*, este irá facilitar a diferenciação destas células de suporte e causará a ativação da proteína quinase A, dentro do oócito<sup>75</sup>. Isto causará um alinhamento microtubular, onde a face crescente destes fica direcionada para o polo posterior<sup>76</sup>. Esta disposição terá como consequência o transporte de proteínas associadas à face decrescente para o polo anterior, assim como o transporte de proteínas associadas ao lado crescente para o polo posterior. Uma destas proteínas associadas ao transporte para o polo anterior, através da interação com estes microtúbulos, é *Bicoid*.

### Expressão de *Oskar*

*Oskar* é um dos intervenientes mais importantes no estabelecimento do eixo antero-posterior, ao auxiliar na organização da disposição dos mRNAs. Tal como *Bicoid*, a produção de mRNA de *Oskar* ocorre através das células de suporte do oócito, que transferem esse mRNA para o oócito. No oócito, este é transportado para o polo posterior, através da interação com os microtúbulos. A expressão deste fator é responsável também pela estabilização e formação de microtúbulos, permitindo uma organização gradualmente mais estabelecida<sup>77</sup>. Apesar de

também apresentar funções no estabelecimento do eixo posterior, o seu principal contributo é através do facilitamento do estabelecimento de outros fatores a serem traduzidos posteriormente.

### Expressão de *Nanos*

*Nanos* é um dos fatores mais importantes no estabelecimento do polo anterior no eixo em formação. Porém, o estabelecimento deste é diferente do apresentado, uma vez que é realizado em duas alturas. Uma ocorre durante um período mais precoce da oogénese, em que este é acumulado de forma desorganizada no oócito; e outra ocorre num período mais avançado da oogénese. Nesta segunda transferência em que temos a gradual transferência deste para o polo posterior<sup>78</sup>. A segunda transferência também apresenta uma velocidade e especificidade menor do que a de outros fatores associados à mesma localização, como *Oskar*. No entanto, tal ineficiência tem como consequência a formação de um gradiente mais desenvolvido de *Nanos*. Este, através da sua interação com *Oskar*, ficará retido no polo posterior, sendo só a sua expressão iniciada com a ativação do ovo pós-fecundado.

### **I.9.2 Formação do eixo antero-posterior**

Com a fecundação do oócito e a ativação do ovo, este começa o processo de replicação nuclear contínua. No entanto, para assegurar que o correto posicionamento da expressão de fatores envolvidos na gastrulação e segmentação, é necessário que o embrião tenha estabelecido um correto padrão para a expressão. Este é conseguido através do estabelecimento do gradiente antero-posterior.

O gradiente é obtido através da tradução de mRNA dos genes maternos envolvidos no gradiente. Estes mRNAs, armazenados nos polos do embrião e que se encontram retidos veem a sua tradução iniciada durante a divisão síncrona. Este é criado pela interação de *Bicoid* e *Nanos*. Apesar de existirem mais interatores, estes dois fatores são os que apresentam principal função. *Bicoid* é responsável pela pelo estabelecimento de toda a expressão génica na zona anterior, atuando nos núcleos que se apresentam na proximidade e igualmente inibindo a ação de marcadores presentes no polo posterior, nomeadamente de diferenciação *Caudal*<sup>79</sup> (Figura 4). De igual modo, no polo posterior, a presença de *Nanos* é responsável pela inibição da

expressão de *Hunchback*<sup>80</sup>. Esta inibição é importante, uma vez que promove o correto estabelecimento estrutural do embrião. Tanto *Bicoid* como *Hunchback* estão envolvidos na ativação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da cabeça e do tórax<sup>81</sup>, enquanto *Nanos* e *Caudal* estão envolvidos no desenvolvimento do restante abdómen e das células germinais que darão origem ao sistema reprodutor<sup>82</sup>. Quando estabelecido o gradiente de *Bicoid* e *Nanos*, estes irão influenciar a expressão de genes ao longo deste, levando à diferente expressão de genes envolvidos na segmentação. A expressão destes genes ocorrerá após a transição da expressão génica por parte das reservas maternas para a expressão endógena, sendo coordenada pelos genes *gap*. *Bicoid* está envolvido na expressão destes genes, ao ser um dos coordenadores do local onde serão expressos.

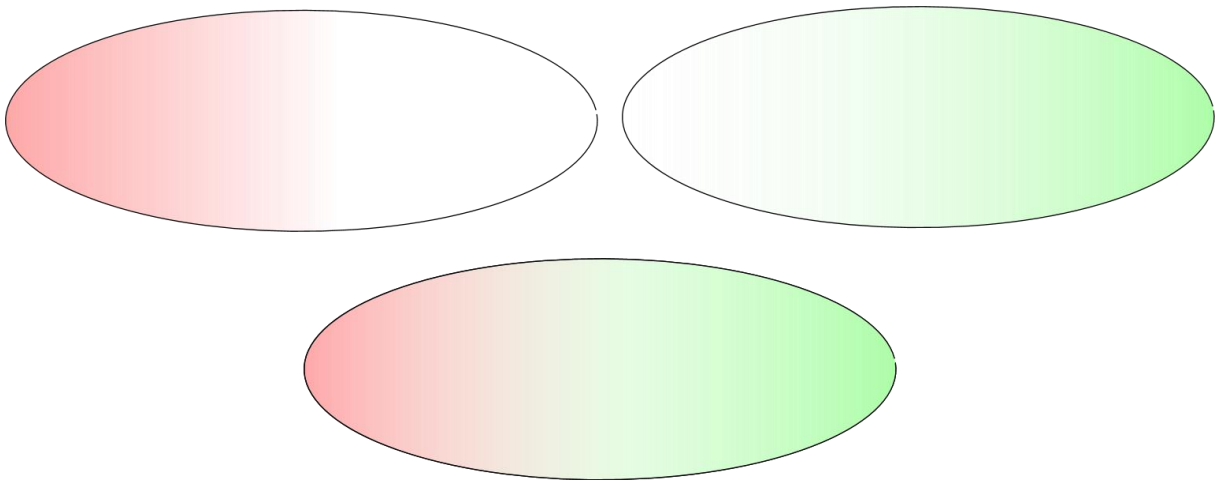


Figura 4 - **Estabelecimento do eixo antero-posterior pela interação de Bicoid e Nanos.** A expressão destes dois genes é responsável pela formação do gradiente de expressão ativado por este. Legenda: *bicoid* (rosa), *nanos* (verde).

### **I.9.3 Estabelecimento da expressão de genes *gap***

Os genes *gap* são genes cuja expressão está associada ao estabelecimento do padrão de expressão envolvido na segmentação embrionária. A sua expressão, que ocorre durante a fase sincicial, é resultado da transição da expressão de fatores maternos para a ativação da expressão dos fatores intrínsecos, nas últimas divisões pré-gastrulação<sup>69</sup>. A expressão destes é definida e dependente da posição do embrião. Em *D. melanogaster*, são nove os genes *gap* envolvidos na segmentação. Estes são *Kruppel*<sup>83</sup>, *Giant*,<sup>83</sup> *Knirps*<sup>83</sup>, *Hunchback*<sup>83</sup>, *Tailless*<sup>84</sup>, *Orthodenticle*<sup>85</sup>, *Buttonhead*<sup>86</sup>, *Empty spiracles*<sup>87</sup> e *Huckebein*<sup>88</sup>. Destes genes *gap*, *Hunchback*, *Kruppel*, *Knirps*, *Giant* e *Tailless* são os principais intervenientes no estabelecimento de genes *gap*. O

indutor de todo o mecanismo é *Bicoid*, que é responsável pelo controlo da expressão na metade anterior, enquanto na metade posterior estes são expressos pela interação com os restantes genes *gap*. A expressão de genes *gap* será síncrona e complementar, sendo cada um responsável pelo controlo dos genes *pair-rule* e de cada uma das estruturas desenvolvidas durante a gastrulação. Destes genes *gap*, *Bicoid* é o principal coordenador, pois é através da expressão deste que a localização dos restantes é estabelecida.

### **I.9.3.1 Estabelecimento da expressão de genes *gap* na metade anterior – *Hunchback***

*Hunchback* (Figura 5) é o primeiro gene *gap* a ser expresso. Este gene tem a sua expressão associada ao gradiente de *Bicoid* estabelecido. Isto implica que a expressão de *Hunchback* é mais intensa no polo anterior e diminuindo gradualmente no sentido do polo posterior, deixando a sua expressão de ser observada na zona central do embrião. Este é um dos responsáveis pela coordenação dos genes envolvidos na correta formação da cabeça.

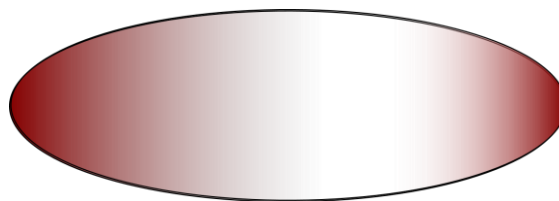


Figura 5 - Expressão embrionária de *Hunchback* ao longo do eixo antero-posterior.

Este coordena a expressão a sua própria expressão, assim como a dos genes *gap* *Kruppel*, *Knirps*, e a posterior expressão do gene *pair-rule* *Eve*<sup>83</sup>. *Hunchback* é capaz de inibir a expressão de *Knirps* e *Kruppel*, mas a expressão de *Kruppel* é mais dinâmica, dependendo da quantidade de *Hunchback* presente.

### **I.9.3.2 Estabelecimento da expressão de genes *gap* na metade anterior – *Knirps***

Como mencionado, *Knirps* (Figura 6) é um dos genes *gap* cuja expressão é auxiliada pela expressão de *Bicoid* e inibida pela concentração de *Hunchback* presente. Este é igualmente um



inibidor da expressão de *Hunchback*, sendo a intensidade da expressão desta resultante das concentrações presentes.

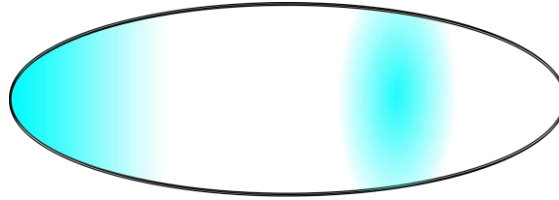


Figura 6 - Expressão embrionária de *Knirps* ao longo do eixo antero-posterior.

### **I.9.3.3 Estabelecimento da expressão de genes *gap* na metade anterior – *Kruppel***

*Kruppel* (Figura 7) é um gene *gap* cuja expressão é controlada pela diferença de concentração deste e de outros genes *gap*, assim como do gene materno *Bicoid*. Este interatua também com *Giant*, bloqueando a sua expressão.

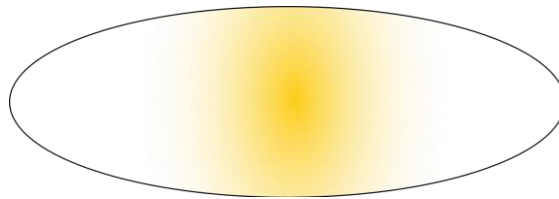


Figura 7 - Expressão embrionária de *Kruppel* ao longo do eixo antero-posterior.

### **I.9.3.4 Estabelecimento da expressão de genes *gap* na metade anterior – *Giant***

*Giant* (Figura 8) é um dos genes *gap* cuja expressão é observada ao longo da extensão do embrião. Este é ativado pela expressão de ambos *Bicoid* e *Caudal*, assim como é inibido pela ação de *Kruppel* e *Tailless*.

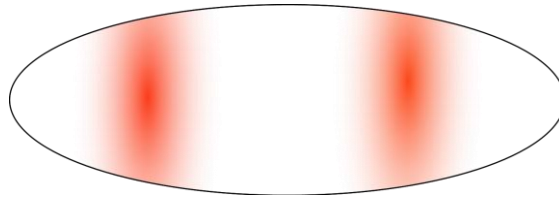


Figura 8 - Expressão embrionária de *Giant* ao longo do eixo antero-posterior.

Isto levará à formação de zonas de expressão de genes *gap* bem definidas, resultando numa correta expressão e localização posterior dos genes *pair-rule*. Esta expressão pode ser observada na Figura 9.

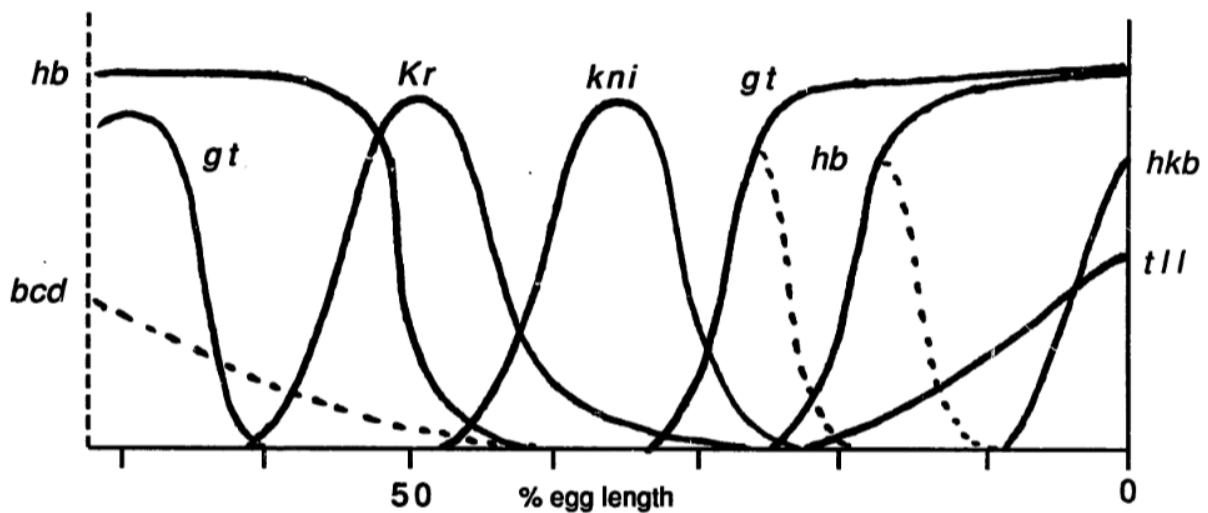


Figura 9 - Gráfico da expressão dos genes *gap*, ao longo da extensão antero-posterior do embrião. Legenda: *Hunchback* (hb), *Bicoid* (bcd), *Kruppel* (Kr), *Knirps* (Kni), *giant* (gt), *tailless* (tll), *huckbein* (hkb). Gráfico retirado de Pankratz et al, *Trends in Genetics* (1990).

#### I.9.4 Estabelecimento da expressão de genes *pair-rule*

Os genes *pair-rule* iniciam a sua expressão durante a fase final do desenvolvimento pré-gastrulação, ocorrendo entre a décima terceira e décima quarta divisão síncrona nuclear. Estes marcam o início da segmentação, sendo os responsáveis pelo estabelecimento dos marcadores envolvidos no correto desenvolvimento segmentário durante a gastrulação. A ativação de genes *pair-rule* ocorre em duas fases: ativação dos genes *pair-rule* primários, através da ativação por parte do padrão preestabelecido pelos genes *gap*; e ativação dos genes *pair-rule* secundários, cuja ativação é realizada pela ação dos *pair-rule* primários já pré-estabelecidos<sup>89</sup>.

#### **I.9.4.1 Estabelecimento dos genes *pair-rule* primários**

Os genes *pair-rule* primários são os primeiros genes envolvidos no processo de segmentação. A sua expressão é iniciada com o estabelecimento das zonas de expressão dos genes *gap*, que através da sobreposição das suas zonas de expressão promovem o correto posicionamento da expressão génica. Desta ativação da expressão, sete genes *pair-rule* serão expressos. Estes são *hairy*, *even-skipped*, *runt*, *fushi tarazu*, *odd-skipped*, *paired* e *sloppy-paired*<sup>90,91</sup>. Destes, *hairy*, *even-skipped* e *runt* são considerados genes *pair-rule* primários, uma vez que a sua expressão é iniciada antes da expressão de *fushi tarazu*, *odd-skipped*, *paired* e *sloppy-paired*. A expressão destes será distribuída ao longo de sete linhas de expressão complementares e a localização de cada um será estabelecida pela interação mútua e pela ativação promovida pelos seus precursores (Figura 10). Da interação com os genes *gap* envolvidos no estabelecimento dos locais de expressão, *Hunchback*, assim como de *Bicoid*, estão envolvidos na ativação da expressão destes<sup>92</sup>. No entanto, a expressão de *Knirps*, *Kruppel* e *Giant*, está envolvida na repressão ativa destes genes<sup>93</sup>. Destes genes *pair-rule* primários, *hairy* e *even-skipped* são os genes cuja ativação e expressão está mais intimamente ligada ao padrão preestabelecido, sendo os restantes também regulados por estes, mas também sofrendo autorregulação. A expressão associada a cada um dos genes é, como ocorre com os genes *gap*, intercalada. Cada segmento é repetido em intervalos entre sete e oito núcleos de distância, sendo estas refinadas posteriormente pela ação do fator *engrailed* e dos genes *pair-rule* *odd-skipped* e *sloppy-paired*, que intercalam a expressão apresentada nestes por colunas de um a dois núcleos de diâmetro destas. Estes fatores estão envolvidos na manutenção do correto estabelecimento dos fatores expressos, salvaguardando a polaridade dos segmentos embrionários em formação<sup>91</sup>.

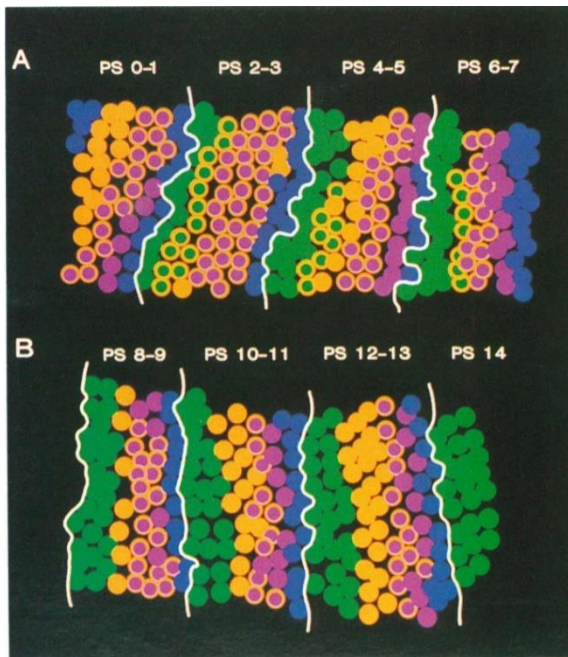


Figura 10 - **Distribuição das bandas de expressão de *hairy*, *fushi tarazu* e *even-skipped* durante a fase final da celularização e início da gastrulação.** A expressão de cada um destes genes *pair-rule* segue um modelo de padronização específico, onde *hairy* (laranja) inibe a expressão de *fushi tarazu* (verde), mas tem a sua expressão compatível com a expressão de *even-skipped* (magenta). Esta coordenação da expressão ocorre ao longo de todo o eixo antero-posterior e culmina na formação de sete bandas de expressão para cada um dos genes envolvidos. Entre a expressão destes três fatores, há também uma curta banda de células em que não é apresentada a expressão de nenhum dos fatores (azul). Imagem retirada de *Carroll et al., Genes & Development (1988)*.

#### **I.9.4.1.1 Interação entre genes *pair-rule* primários e estabelecimento segmentar**

O estabelecimento do padrão de expressão característico da ação dos genes *pair-rule* não é constante, mas varia conforme o estado de desenvolvimento embrionário. No período pré-gastrulação, os primeiros genes a serem expressos são *even-skipped* e *hairy*. Estes genes, sendo os primeiros a serem expressos, irão auxiliar na coordenação da expressão de outros genes.

*Hairy* está envolvido no controlo da expressão dos restantes genes *pair-rule*, sendo capaz de inibir a expressão de *fushi tarazu*, *runt* e *odd-skipped*<sup>91,94</sup>. *Even-skipped* também atua na coordenação dos restantes genes *pair-rule*, reprimindo também a expressão de *fushi tarazu*, *runt* e *odd-skipped*<sup>91,94,95</sup>. Na obstante, tanto *even-skipped*, como *hairy*, também veem a sua expressão influenciada pela expressão de outros genes *pair-rule*. Estes dois genes são capazes

de coordenar a sua expressão através de repressão mútua. No entanto, o grau com que os diferentes genes *pair-rule* interagem é diferente.

Os genes *hairy* e *even-skipped* têm a sua expressão dinâmica, bloqueando-se mutuamente e nunca tendo sobreposição de expressão. Estes bloqueiam também *fushi tarazu*, *runt* e *odd-skipped*, servindo como limitadores das zonas de expressão destes genes. Destes, *runt* é também controlado por *odd-skipped*, mas este controlo não é completo (Figura 11), uma vez que *runt* tem também expressão parcial quando em contacto com *fushi tarazu*, *odd-skipped* e *even-skipped*. De igual modo, *fushi tarazu* e *odd-skipped* também têm expressão intercalada com *hairy*<sup>91</sup>.

Este estabelecimento inicial irá continuar durante as fases seguintes do desenvolvimento, sendo o gradiente mais organizado durante a gastrulação e culminando com o correto estabelecimento dos segmentos no final desta.

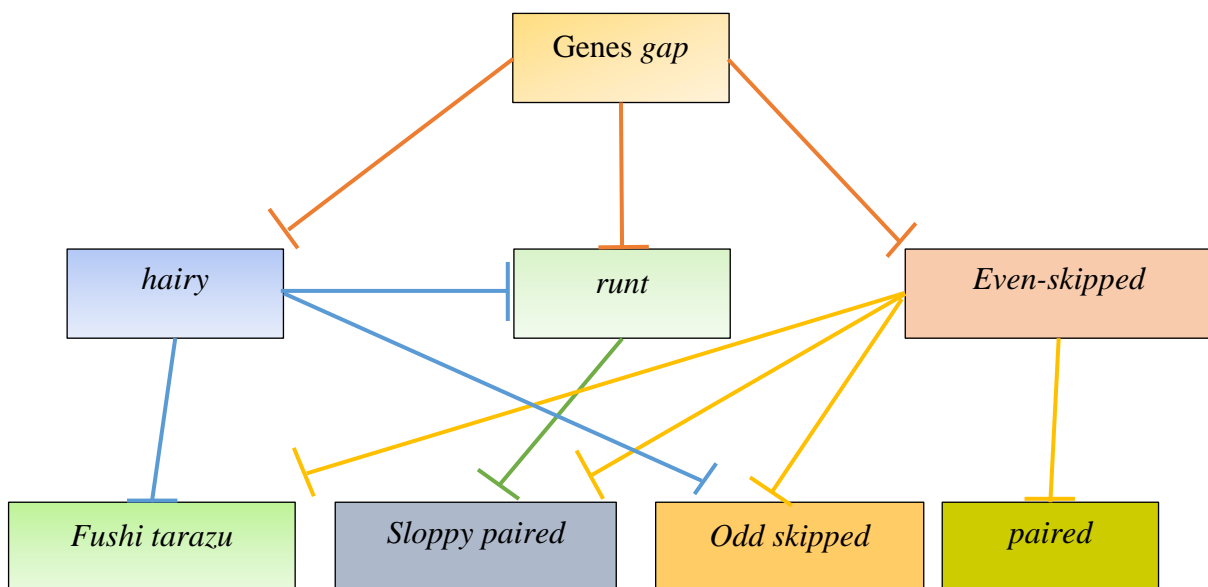


Figura 11 - **Representação esquemática da repressão realizada entre genes *gap*, genes *pair-rule* primários e genes *pair-rule* secundários antes da gastrulação.** Durante o estabelecimento dos padrões de expressão dos genes *pair-rule*, a posição inicial onde os genes *pair-rule* primários serão expressos é predeterminada pela coordenação entre o equilíbrio de fatores potenciadores e inibidores da expressão destes, fomentada pela pelos genes *gap*. Estes induzem a expressão inicial de *hairy*, *runt* e *even-skipped*. A expressão destes genes *pair-rule* primários irá coordenar a localização onde os genes *pair-rule* secundários irão ser expressos, igualmente através da indução e inibição precisa dos genes *pair-rule* secundários.

## I.9.5 Gastrulação

### I.9.5.1 Estabelecimento das camadas germinativas

Com o término da celularização e o estabelecimento posicional dos genes *pair-rule*, associado à completa transição na origem da expressão génica do embrião, este transita para a gastrulação.

A gastrulação é o processo pelo qual a blastoderme sincicial se desenvolve, levando ao desenvolvimento dos três tecidos germinativos que dão origem a todos os restantes tecidos do organismo. Estes tecidos apresentam-se bem definidos espacialmente. Como noutros organismos multicelulares, estes são a ectoderme, mesoderme e a endoderme (Figura 12).

A ectoderme primordial ocupa diferentes áreas do embrião, sendo encontrada nas regiões dorso lateral e ventral, delimitando a área de ação que as outras camadas germinativas ocupam<sup>96</sup>.

A mesoderme apresenta-se predominantemente na zona ventral do embrião, ocupando cerca de 80% da extensão total e 20% da superfície circunferencial do embrião<sup>97</sup>.

A endoderme está presente predominantemente em duas zonas do embrião, sendo uma encontrada anteriormente à mesoderme estabelecida e a outra encontrada posteriormente à mesoderme. Da endoderme presente nestas duas localizações, a endoderme presente numa posição anterior à área constituída por mesoderme está localizada na zona ventral, enquanto a endoderme localizada na zona posterior à mesoderme engloba toda a área circundante do polo posterior<sup>97</sup>.

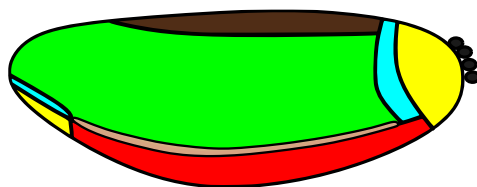


Figura 12 - **Representação esquemática das camadas germinativas num embrião de *D. melanogaster* durante a gastrulação.** Durante as fases iniciais da gastrulação, dá-se o estabelecimento das camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) que serão responsáveis pela formação de todos os tipos de tecidos presentes no organismo adulto. Em *D. melanogaster*, a endoderme (amarelo) é encontrada nas extremidades embrionárias, a mesoderme (vermelho) é encontrada de forma dispersa ao longo de toda a zona ventral e a ectoderme (verde) ocupa grande parte da área dorsal do embrião. Este é também constituído por outras camadas extra. Este apresenta também a amnioserosa (castanho-escuro), uma camada de tecido extraembrionário envolvida no suporte e

coordenação das alterações morfológicas do embrião; a mesectoderme (castanho-claro), uma zona de transição entre a mesoderme e a endoderme que apresenta características presentes em ambas camadas; e as zonas de formação do tubo digestivo (azul), que marcam o local onde o tubo digestivo se irá formar.

### **I.9.5.2 Desenvolvimento estrutural durante a gastrulação**

O desenvolvimento embrionário, no início do processo de gastrulação, está associado à reestruturação do embrião, através da reorganização celular das células recém-formadas. A gastrulação é iniciada com inicial migração celular, que causa a formação de sulcos transientes. O primeiro a se desenvolver é o sulco cefálico. Este sulco tem origem no polo anterior do embrião e desenvolve-se ao longo da metade anterior do mesmo<sup>98</sup>. Simultaneamente à formação do sulco cefálico, são estabelecidos os sulcos dorsais transversais, também presentes na metade anterior e em proximidade do polo. Apesar de desconhecida a sua função específica, devido à proximidade apresentada para com a futura localização dos segmentos que dão origem à cabeça e tórax, é argumentado que esta pode ter como função a coordenação do desenvolvimento inicial destas estruturas, dando a marcação para estas duas áreas<sup>98</sup>.

Estes sulcos formados na metade anterior são os primeiros a serem originados, pelo que apresentam um maior desenvolvimento face ao apresentado pelos sulcos posteriormente criados na metade posterior. Esta formação mais precoce está associada à ação do gene *pair-rule* *paired*<sup>99</sup>.

Com o estabelecimento dos sulcos anteriores, a zona ventral começa a sofrer invaginações que culminarão na formação do sulco ventral. Este sulco é de grande importância, uma vez que irá permitir a migração das células da mesoderme em formação para o interior do embrião<sup>100</sup>. Simultaneamente à formação do sulco ventral, no centro da metade posterior começa a ser observada uma invaginação que culminará na migração da população celular que constituirá a formação do trato digestivo. No final desta reorganização e com a invaginação da mesoderme dá-se a extensão antero-posterior do embrião<sup>98</sup>.

### **I.9.5.2.1 Desenvolvimento do sulco cefálico**

O sulco cefálico é uma das primeiras alterações observadas durante o início do processo de gastrulação. Este é formado em proximidade do polo anterior e tem a sua formação com o estabelecimento de uma fissura que circunda todo o polo anterior do embrião, incitada pela expressão e interação entre *Bicoid*, *Hunchback*, e os genes *gap* expressos na parte anterior do embrião, *paired* e *even-skipped*. Esta interação génica causa a ativação das células iniciadoras, que por via dessa interação génica começam um processo gradual de invaginação, formando o sulco<sup>98</sup>.

A localização deste sulco é coincidentemente presente na zona que demarca as áreas que darão origem à cabeça e torso<sup>101</sup>.

### **I.9.5.2.2 Desenvolvimento dos sulcos dorsais transversais**

Também durante a fase inicial da gastrulação, um fenómeno semelhante ao apresentado na formação do sulco cefálico ocorre na zona dorsal. Contrariamente ao comumente observado, a formação ocorre no sentido posterior-anterior, com o estabelecimento de dois sulcos ventrais. Estes sulcos são transientes, desaparecendo no final da gastrulação, com a expansão celular. A formação dos sulcos dorsais está associada com a interação dos diferentes padrões genéticos apresentados na formação dos eixos embrionários. Destes padrões, o gene *pair-rule runt* é o principal organizador, tendo as suas bandas de expressão localização complementar com a localização dos sulcos dorsais<sup>102</sup>. Quando se dá o estabelecimento dos sulcos no sentido transversal, estes iniciam uma expansão lateral.

A expansão lateral é consequência da reorganização e expansão celular, através da alteração das junções que permitem a aderência celular<sup>98</sup>. A alteração das junções é realizada através da interação destas com a microtúbulos, que por via da ação de fatores como *Patronin* e *Proteinase-activated receptor (Par1)*, levam ao controlo dos microtúbulos e causam a alteração das células apicais. Esta alteração causa o gradual aprofundamento do sulco<sup>103</sup>.



### **I.9.5.2.3 Formação do sulco ventral**

O sulco ventral é uma das principais alterações estruturais presentes no embrião. Este sulco, formado nos estádios iniciais da gastrulação, estendendo-se ao longo da zona ventral. O início da formação do sulco ventral ocorre nos estádios finais da celularização da blastoderme ventral e é caracterizada por uma gradual alteração das características das células presentes. Estas células, das quais estão presentes células que darão origem a tecido mesodérmico, começam a sofrer alterações estruturais que as tornam gradualmente mais planares.

O estabelecimento desta população celular de características planares causará a gradual contração das células presentes no centro, causando a sua invaginação. Esta invaginação será gradual, com as células circundantes a gradualmente se deslocarem para a posição ocupada pelas células que invaginaram. Isto causará uma movimentação de massa celular para o interior do embrião, levando ao estabelecimento de uma estrutura tubular que estará na origem da formação da mesoderme.

### **I.9.5.2.4 Extensão antero-posterior**

Durante a gastrulação, o embrião em desenvolvimento sofre um aumento gradual da população celular. Este aumento populacional, associado à ação estabelecida pelos genes envolvidos na padronização irá ser o indutor para a principal para as movimentações observadas.

A extensão celular antero-posterior é o resultado dessas movimentações. Esta começa a ocorrer simultaneamente à formação do sulco ventral. A banda de células da extensão antero-posterior é composta por células de diferentes origens germinativas: estas incluem as células presentes no sulco ventral, assim como as células da ectoderme ventral, dorsal e lateral. Esta estende-se ao longo de toda a superfície ventral, estando confinada entre o sulco cefálico até ao polo posterior do embrião. A extensão do embrião ocorre durante dois períodos distintos: um período de divisão e movimentação rápido, onde se dá uma acelerada expansão da banda germinativa; e uma fase mais lenta, onde o embrião consolida o as células envolvidas na expansão mais acelerada e permite que o embrião atinja a sua proporção máxima<sup>104</sup>.

A movimentação celular ocorre através de dois movimentos simultâneos (Figura 13), em que há uma expansão da população de células ao longo do eixo dorsoventral e uma movimentação simultânea antero-posterior. Esta dupla movimentação causa a ocorrência de uma movimentação cíclica, em que se dá a expansão do embrião.



**Figura 13 – Movimentação das populações celulares durante a gastrulação em *D. melanogaster*.** Durante a gastrulação, o embrião de *D. melanogaster* desenvolve-se rapidamente, sofrendo alterações morfológicas. A alteração mais importante envolve um movimento migratório celular, sendo que há uma movimentação no sentido dorsoventral associado a um movimento no sentido antero-posterior. Imagem retirada de *Gheisari et al, Mechanisms of Development (2020)*.

### **I.9.6 Estabelecimento das camadas germinativas**

Com o culminar dos movimentos celulares obtidos durante a gastrulação, são estabelecidas as camadas germinativas necessárias para o desenvolvimento correto de todos os tecidos presentes no organismo. Como está presente noutros tipos de organismos multicelulares, as três camadas germinativas são a ectoderme, mesoderme e endoderme.

A ectoderme embrionária é estabelecida durante a gastrulação, com o estabelecimento dos sulcos ventral e cefálico. O tipo de tecido que será originado por esta camada germinativa depende da localização onde esta seja encontrada. Ao longo do eixo dorsoventral e localizado entre as duas zonas de mesoderme primitiva estão localizadas a mesectoderme, a neuroectoderme e ectoderme lateral<sup>105</sup>.

A mesectoderme é a camada da ectoderme que separa a mesoderme ventral da ectoderme lateral. Esta é uma zona de transição, tendo características de ambos tecidos. Quando é iniciada a internalização da mesoderme, a mesectoderme forma a zona central do embrião, uma vez que acompanha o movimento da mesoderme, e estabelece-se na zona de transição entre a mesoderme e a neuroectoderme. Com a gradual internalização, a mesectoderme irá desenvolver-se e dar origem às células da glia, assim como do sistema nervoso central<sup>106</sup>.

A neuroectoderme é a porção de células da ectoderme envolvida no estabelecimento da população celular envolvida na formação de neuroblastos, assim como de toda a rede nervosa do sistema nervoso periférico. Esta é estabelecida durante o processo de invaginação da mesectoderme e da mesoderme, ficando estabelecida na periferia do sulco ventral. Esta irá começar a desenvolver-se com o estabelecimento segmentar e o desenvolvimento de cada um deles.

A ectoderme lateral é a porção da ectoderme cuja função está associada ao correto desenvolvimento estrutural do embrião, uma vez que a sua extensão permite o correto posicionamento e expansão das restantes camadas, assim como a correta invaginação celular no sulco ventral<sup>107</sup>. Esta, através de uma forte força de adesão celular, permite uma constante manutenção da compressão celular. Esta força aplicada mantém as células circundantes organizadas, facilitando a movimentação celular e causando o dobramento e invaginação celular na periferia do sulco ventral.

O estabelecimento e desenvolvimento da mesoderme é um dos processos mais importantes decorrentes da gastrulação. Durante o desenvolvimento da mesoderme, esta sofre alterações epitélio-mesenquimais que promovem a sua extensão e expansão, assim como promovem a sua invaginação através dos diversos sulcos embrionários formados<sup>100,105</sup>.

As células que perfazem a mesoderme primitiva, presentes na zona ventral, vêm a sua expressão afetada pela ação do fator *Dorsal*. Este promove a expressão de *Snail* e *Twist*. Só através da expressão mútua destes fatores é que o tecido mesodérmico adquire as suas características<sup>105</sup>. *Snail* é importante pois atua como um repressor de transcrição que delimita a expressão génica para a mesoderme primitiva. *Twist* atua de forma mais generalizada, sendo um indutor para a expressão génica geral posterior da mesoderme.<sup>108</sup>

A expressão de *Snail* é importante para a repressão da expressão de *neuralized*, assim como em ação conjunta com *Twist* estes ativam a expressão de *Mist*, recetores da proteína *G* e a proteína transmembranar *T48*. Estas proteínas possuem todas funções envolvidas no controlo do citoesqueleto, através do controlo de microtúbulos e das junções que permitem a agregação celular. Isto será importante, uma vez que é através deste restrito controlo que serão possíveis a locomoção celular e a invaginação das mesmas<sup>105,109</sup>.

### **I.9.6.3 Estabelecimento da endoderme**

Tal como as restantes camadas, a endoderme é estabelecida durante a gastrulação. Esta estabelece-se anteriormente e posteriormente à mesoderme ventral, assim em toda a extensão circundante do polo posterior.

Tal como ocorre com a ectoderme e mesoderme, durante a gastrulação a endoderme sofre invaginações graduais. A invaginação desta camada germinativa ocorre em duas zonas distintas, sendo uma na zona anterior do embrião e a outra na zona central do embrião. A invaginação que ocorre a esta camada germinativa está na origem da formação do tubo digestivo.

A endoderme primitiva tem a sua gradual translocação para os locais onde se irá estabelecer durante a fase de extensão do embrião. Esta translocação é, como ocorre com a mesoderme, resultado da expressão de certos fatores que promovem a alteração da estrutura celular e permitem que haja a movimentação destas. Na endoderme posterior, são *Huckebein* e *Tailless* os responsáveis pela promoção da expressão de *Fog*<sup>110</sup>. Este fator está envolvido no controlo da função associada a miosina. No entanto, contrariamente ao que ocorre na propagação da mesoderme, *Fog* é capaz de causar a ativação de miosina, sendo esta capaz de propagar a sua ativação sem a necessidade de expressão génica constante. Isto implica que a expressão de *Snail* e *Twist*<sup>110,111</sup>.

O estabelecimento das três camadas é o indutor para o correto posicionamento estrutural embrionário, que ocorre pela predeterminada expressão local adequada dos genes envolvidos na segmentação polar.

### **I.10 Segmentação**

O processo de segmentação é um processo que pode ser separado em três etapas principais: estabelecimento de genes maternais e *gap*, genes *pair-rule* e genes de segmentação polar. Este processo ocorre através da transição do uso de material genético materno para uma expressão própria do organismo, causando uma gradual organização do local onde estes genes organizadores se localizam. Esta é estabelecida pela continuada expressão de diferentes fatores que gradualmente vão especificando o local onde cada tipo de genes será expresso. Como já

indicado, a fase inicial da segmentação é regulada pela expressão de genes *gap*. Estes genes ativam numa fase mais tardia a expressão dos genes *pair-rule*, cuja expressão ocorre no final do período pré-gastrulação e continuam durante a mesma, regulando a expressão dos genes de polaridade segmentar.

### **I.10.1 Genes *gap***

Como já mencionado, os genes *gap* têm a sua expressão iniciada na fase final da fase de divisão nuclear antes da celularização ocorrer, entre o décimo terceiro e décimo quarto ciclos de replicação. Nesta etapa inicial da segmentação, os genes *gap* são ativados através da expressão pré-estabelecida por parte dos genes maternos. O local de expressão de cada um dos genes *gap* é também inicialmente estabelecido não só pelo local onde a expressão de genes maternos os promove, mas pela ação mútua de repressão que apresentam. A expressão de cada gene *gap* ocorre por via de gradientes de concentração, associados à interação do gene com outros que possam causar a sua expressão ou repressão<sup>69</sup> (Figura 14).

Esta expressão dinâmica acaba por causar o estabelecimento daquilo que é a segmentação inicial, levando à expressão dos genes *gap* em zonas específicas

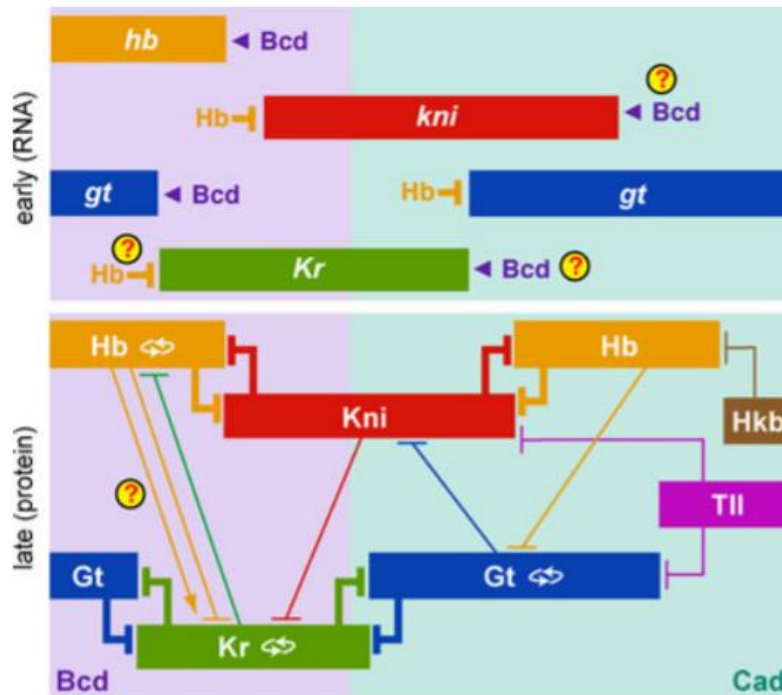


Figura 14 - **Interação entre genes *gap* no início da sua expressão e quando esta já se encontra estabelecida.** A expressão génica dos genes *gap* é de natureza dinâmica, sendo as interações realizadas num estadio inicial baseadas somente em gradientes de origem materna. Em estadios mais tardios onde já se apresenta uma expressão mais robusta dos mesmos, estes apresentam uma regulação baseada na interação estabelecida entre si. Esquema retirado de Jaeger, *Cellular and Molecular Life Sciences* (2011).

### I.10.2 Genes *pair-rule*

#### I.10.2 Genes *pair-rule* primários

Os genes *pair-rule* primários são ativados durante a última divisão cíclica do embrião pré-gastrulação, durante a fase de celularização. Nesta fase de transição, a expressão anterior dos genes *gap* é o indutor que permite a expressão mais definida dos genes *pair-rule*. Estes genes *pair-rule*, dos quais a expressão está intimamente ligada à expressão de genes *gap* são *runt*, *even-skipped* e *hairy*. Estes são considerados os genes *pair-rule* primários, uma vez que a sua expressão é a primeira a ocorrer. Destes, a expressão de *even-skipped* e de *hairy* é igualmente a mais pré-determinada, uma vez que a sua expressão é totalmente controlada só pela expressão associada aos genes *gap*, ao invés de *runt*<sup>91</sup>. Isto implica que a expressão génica de genes *pair-rule* primários ocorre como a associada aos genes *gap*, através de expressão cíclica por via de gradientes de concentração. Isto levará à formação de sete faixas de expressão para cada um

dos genes *pair-rule* primários. Será através desta expressão inicial e ao haver o estabelecimento das faixas que os parassegmentos irão ser formados. A localização de cada faixa é também bem definida.

#### Localização da expressão de *even-skipped*

A expressão de *even-skipped* ocorre ao longo de sete faixas de expressão que circundam toda a superfície do embrião e que se estendem ao longo do eixo antero-posterior. A localização destas faixas é também especificada. Esta ocorre nas zonas em que há uma expressão mais concentrada de *Hunchback*, onde este ativa ou reprime a expressão de *even-skipped* através da interação deste com os promotores do gene. A interação de *Hunchback* é também controlada pela presença de outros fatores envolvidos no controlo da expressão, como *caudal*. A interação entre fatores leva à expressão diferenciada de *even-skipped*, que com o acumular proteico será regularizado pela interação deste com os restantes genes<sup>1,112</sup>. A expressão de *even-skipped* é portanto somente regulada pela posição onde a expressão de *Hunchback* e outros fatores associados a induzem.

#### Localização da expressão de *runt*

A expressão do gene *pair-rule* primário *runt* ocorre em dualidade: a sua expressão é parcialmente como a de *hairy* e *even-skipped*, sendo ativada pela expressão de *Hunchback*, mas a sua expressão é igualmente reprimida pela ação de *Hairy*. *Runt* também tem a sua expressão realizada ao longo de sete faixas de expressão. As faixas de expressão de *runt* são encontradas de forma intercalada com as de *Hairy*, mas apresentam sobreposição parcial com as faixas de expressão de *even-skipped*<sup>113</sup>.

#### Localização da expressão de *Hairy*

*Hairy* é um dos três genes *pair-rule* primários, sendo a sua expressão somente influenciada pela ação de genes maternos e genes *gap*. Como observado nos restantes genes *pair-rule* primários, a expressão de *Hairy* está associada à ativação da expressão por via da concentração de fatores como *Hunchback*, que ativam a expressão por interação com os promotores do gene. Na obstante, a expressão deste gene não é somente controlada por *Hunchback*. A expressão de

*Hairy* é simultaneamente controlada pela expressão do gene materno *Bicoid*, que promove a expressão na metade anterior do embrião. A expressão dos genes *gap Kruppel* e *Knirps* é igualmente importante, pois contribuem para o correto posicionamento das faixas em formação<sup>114</sup>.

#### Correlação entre o posicionamento e regulação da expressão de *Hairy*

O posicionamento das bandas de expressão de *Hairy* é, como anteriormente observado, realizado através da íntima interação entre os núcleos presentes nos locais onde este é expresso e os fatores que influenciam a expressão destes. Esta interação é predominantemente organizada pela expressão de *Bicoid*, *Kruppel*, *Knirps*, *Hunchback*, *caudal* e *Nanos*.

#### Banda 1

A expressão de *Hairy* na primeira banda é totalmente regulada pela interação dos promotores com a expressão local de *Bicoid* e está envolvida no desenvolvimento da parte do embrião que dá origem à cabeça, uma vez que esta é também regulada por fatores da área dorsoventral<sup>115</sup>.

#### Banda 2

A expressão de *Hairy* na banda 2, apesar de presente, não é tão fortemente expressa como as bandas circundantes. A expressão presente nesta localização é fomentada pela ação de *even-skipped* e de *runt*, uma vez que a sua ação permite que haja um refinamento da zona anterior e posterior à banda<sup>116</sup>.

#### Banda 3 e banda 4

A terceira e quarta banda de expressão de *Hairy* aparecem na zona intermediária do embrião, estando localizadas na zona de transição da expressão de *Bicoid*, *Hunchback*, *caudal* e *Nanos*. Devido a este ambiente em que não há um fator predominantemente mais expresso do que os outros, as bandas são produzidas pela ação doutros fatores do que os que marcam o eixo antero-posterior. Neste local, os fatores cuja expressão é mais predominante são *Kruppel* e *Knirps*<sup>115,117</sup>.



### Banda 5

A regulação que leva à expressão da quinta banda de expressão de *Hairy* começa a apresentar características que a diferem das anteriores. Como esta banda já se apresenta mais afastada do polo anterior, a indução da expressão, fomentada pela presença dos fatores associados a esta área, deixam de ser estar presentes. Esse facto é comprovado pela variação da expressão desta banda. A quinta banda de expressão vê a ativação da expressão através da ação dos fatores *Kruppel* e *Knirps*, que atuam por promoção da expressão, mas também pela ação regulatória de *Giant*, que pela sua interação com *Kruppel* e *Knirps*, serve de marcador para a delimitação da banda<sup>115</sup>.

### Banda 6

A formação da sexta banda está, como ocorre com as bandas anteriores, associada à expressão genica de fatores envolvidos no estabelecimento do eixo na metade posterior. Por esse motivo, os fatores que levam à expressão entre a quinta, a sexta e a sétima banda são gradualmente diferentes. Nesta banda, a expressão de *Kruppel* deixa de ser um fator que promove a expressão, mas a expressão de *Knirps* continua a estar presente e a promover a expressão de *Hairy*. Apesar de importante, *Knirps* não é o único fator envolvido na expressão desta banda. A expressão de *Giant* e *caudal* são também importantes para a correta expressão da faixa, assim como a expressão de *Tailless* é importante devido à sua ação no estabelecimento do limite posterior da banda<sup>115,118</sup>.

### Banda 7

A sétima banda de expressão de *Hairy* é a banda cuja expressão ocorre na porção mais posterior do embrião. Como esta banda está localizada na posição mais posterior do embrião, o principal fator envolvido na expressão deste é *caudal*. *Caudal* não é, porém, o único fator envolvido na expressão da sétima banda. Esta é também influenciada pela expressão de *Bicoid* e *Kruppel*. Destes três fatores envolvidos na indução da expressão, *caudal* e *Bicoid* atuam somente como indutores, enquanto *Kruppel* apresenta uma ação dupla. Dependendo da sua concentração, este pode atuar como indutor ou inibidor da expressão, sendo que atua como repressor quando este apresenta uma concentração mais elevada<sup>119</sup>.

O estabelecimento da expressão dos três genes *pair-rule* primários é a chave para o estabelecimento da parassegmentação inicial, que ocorre antes do início da gastrulação. É também durante esta fase de transição, em que o embrião entra na fase gastrular, que a expressão dos genes *pair-rule* secundários ocorre. Estes genes estão envolvidos na especificação mais detalhada daquilo que serão os segmentos que se formarão no final da gastrulação e cujo local de expressão destes genes *pair-rule* secundários. O local e a interação da expressão que vão demonstrar é baseada no padrão que os três genes *pair-rule* primários formaram, estando a expressão destes dependente do local de origem.

### **I.10.3 Genes *pair-rule* secundários**

A expressão dos genes *pair-rule* secundários é resultado da expressão anterior e do estabelecimento das zonas de expressão dos genes maternos, genes *gap*, mas principalmente dos genes que promovem a expressão destes: os genes *pair-rule* primários.

Estes genes *pair-rule* primários (*even-skipped*, *runt* e *hairy*) são os responsáveis pela expressão daqueles que são os genes *pair-rule* secundários. Estes são *fushi tarazu*, *odd-skipped*, *paired*, *odd-paired* e *sloppy-paired*<sup>91,120</sup>. A expressão de genes *pair-rule* secundários é responsável pelo estabelecimento daquilo que será a posterior expressão dos genes de polaridade segmentar, sendo estes genes os responsáveis pela correta posição com que o embrião pós-gastrular irá desenvolver as suas estruturas. Tal como ocorre com os genes *pair-rule* primários, estes também se irão desenvolver sob a forma de sete bandas de expressão.

A expressão dos genes *pair-rule* secundários está dependente da ação promotora de *Even-Skipped*, *Runt* e *Hairy*. Como ocorre com outros fatores, estes são também regulados através de interações que promovem ou inibem a sua expressão.

#### Expressão de *fushi tarazu*

A expressão de *fushi tarazu* é altamente regulada pela expressão promovida pelos genes *pair-rule* primários. Destes, *runt* é o gene que promove a expressão de *fushi tarazu*<sup>113</sup>. A expressão é observada ao longo de toda a extensão do embrião, mas as bandas de expressão só são visíveis em zonas predeterminadas. Esta predeterminação está relacionada com as zonas onde estão estabelecidas a expressão de *Even-Skipped* e *Hairy*. Estes dois fatores estão envolvidos na

repressão ativa de *fushi tarazu*, contribuindo para a determinação das fronteiras anteriores e posteriores das bandas de expressão<sup>91,115,121,122</sup>.

*Fushi Tarazu* é também responsável pela promoção da expressão de outros genes *pair-rule* secundários. Este é responsável pela promoção a expressão do gene *odd-paired*, assim como de *paired*. Este também está envolvido na ativação da posterior expressão de *engrailed*<sup>123</sup>.

Através desta regulação, a expressão de *Fushi Tarazu* será encontrada nos locais onde *Runt* tem a sua expressão ativa e será controlada pela repressão realizada por *Hairy* e *Even-Skipped*, com a expressão a ocorrer de forma cíclica. É também observado que entre cada um dos segmentos de expressão de *Fushi Tarazu-Hairy-Even-Skipped* há a formação de uma zona celular onde nenhum dos fatores é prevalente.

#### Expressão de *odd-skipped*

A expressão de *odd-skipped*, assim como a apresentada por *fushi tarazu*, é regulada através da repressão realizada por *Even-Skipped* e *Hairy*. Este também tem como funcionalidade a repressão da expressão de *engrailed* em estádios de desenvolvimento mais tardios. Este atua dinamicamente com *Fushi Tarazu* e *Even-Skipped*, sendo a dinâmica entre estes três elementos fulcral para o estabelecimento posicional de *engrailed*. Este atua por repressão, ao reprimir a expressão de *engrailed*. Por sua vez, a expressão de *Fushi Tarazu* promove a transcrição de *engrailed*. A expressão de *Even-Skipped* inibe a transcrição de *odd-skipped*. Desta forma, a expressão de *engrailed* é fomentada pela expressão de *Fushi Tarazu*, mas é posteriormente reprimida pela expressão de *Odd-Skipped*. Por sua vez, a expressão de *Odd-Skipped* é reprimida pela ação de *Even-Skipped*. Isto eventualmente causa o controlo da expressão de *engrailed* através da expressão promovida por *Fushi Tarazu*, mas que é posteriormente inibida por *Odd-Skipped*. Como há inibição por *Even-Skipped*, dá-se a formação de uma zona onde a expressão é simultaneamente ativada e a repressão reprimida, permitindo que seja expresso<sup>72,124</sup>. A sua expressão é alcançada pela ação génica previamente estabelecida, não sendo influenciada por nenhum fator em particular.

#### Expressão de *paired*

A expressão do gene *pair-rule paired* ocorre com o estabelecimento promovido pela expressão dos genes *pair-rule* primários. Este também forma inicialmente sete bandas de expressão, sendo

a sua expressão independente dos fatores já presentes<sup>72</sup>. Este tem um desenvolvimento semelhante ao apresentado por genes expressos anteriormente, uma vez que tem um desenvolvimento gradual, iniciando o seu desenvolvimento a partir da zona central do embrião<sup>99</sup>. Este fator expresso expande gradualmente, expandindo-se para o polo anterior e posterior<sup>125</sup>. Este também está envolvido no controlo da expressão de outros genes *pair-rule* e de polaridade segmentar. *Paired* tem a sua expressão regulada pela ação de *Caudal*, assim como por *Even-Skipped*. Estes genes inibem a expressão de *paired*, permitindo que a expressão seja localizada intervaladamente com a expressão de *even-skipped*. Simultaneamente, *Paired* está envolvido na expressão de *engrailed*<sup>91</sup>.

#### Expressão de *sloppy-paired*

*Sloppy-paired* é um dos genes *pair-rule* secundários cuja ativação da expressão não está diretamente associada a nenhum dos genes envolvidos no estabelecimento da parassegmentação. O início da sua expressão ocorre como a associada a *Paired*, sendo a expressão iniciada por via da interação com o gradiente presente. A sua expressão é, no entanto, altamente controlada. *Sloppy-paired* tem a sua expressão controlada por uma variedade de outros genes *pair-rule*, sendo a sua expressão inibida pela ação de *Even-Skipped* e *Runt*, mas posteriormente este é também inibido por via da repressão causada por *Fushi Tarazu* e *Odd-Paired*<sup>91</sup>. Este gene é altamente regulado, uma vez que atua como refinador da expressão de outros genes envolvidos no posicionamento segmentar.

#### Expressão de *odd-paired*

A expressão de *Odd-Paired* ocorre de forma parcialmente diferente da apresentada pelos restantes genes *pair-rule*. Este gene é expresso não como um marcador para a correta formação dos segmentos embrionários, mas sim como um marcador geral que atua como coordenador da ação dos restantes genes ativos, estando responsável pela transição da expressão que marca a parassegmentação para a segmentação em si<sup>91,126</sup>. A sua ativação também não ocorre na fase de transcrição inicial dos genes *pair-rule* primários, assim nem como na fase de transição em que há o início da transcrição dos genes *pair-rule* secundários. A sua expressão ocorre mais tardiamente, quando estes já se encontram expressos e com demarcação definida. Durante a sua interação inicial, a expressão de *odd-paired* é regulada pela sua interação como os outros genes

envolvidos na padronização. A ação que *Odd-Paired* promove é a de refinar as zonas de interação já previamente estabelecidas entre os padrões de expressão de genes *pair-rule*. *Odd-paired* atua ao modificar as interações já estabelecidas, tornando-as mais dinâmicas. Através desta ação, entre o final do estabelecimento dos padrões de expressão de genes *pair-rule* e o início da expressão dos genes envolvidos na segmentação, a expressão de *Odd-Paired* causa a alteração dos fatores necessários para a expressão de *odd-skipped*. Este, na presença de *Odd-Paired*, vê a sua expressão realizada pela inibição de *runt*, *engrailed* e *sloppy-paired*. Por sua vez, a expressão de *odd-skipped*, quando não está sob a ação de *Odd-Paired*, é silenciado pela ação de *Hairy* e *Even-Skipped*.

#### **I.10.4 Formação das bandas de expressão**

A expressão génica, desde o início da ativação da maquinaria genética relacionada com a expressão dos genes *gap* até ao estabelecimento final dos genes envolvidos na segmentação, é realizada com uma função principal: formar bandas de expressão que permitem uma gradual especialização da expressão génica, que culmina na formação de sucessivos segmentos que subdividem o embrião levam à correta posição das estruturas embrionárias em formação.

A segmentação ocorre durante três períodos, sendo estes um período pré-celularização, onde se dá a expressão dos genes maternos, seguidos dos genes *gap* e terminando com o início da expressão dos genes *pair-rule*; fase pós-celularização, durante a gastrulação e onde a expressão de genes *pair-rule* transita para a expressão de genes de polaridade segmentar e uma fase pós-celularização mais tardia, onde se dá o refinamento final da expressão estabelecida pelos genes de polaridade segmentar e onde vai ser atribuído a cada segmento a expressão específica associada a este<sup>1</sup>.

A formação das bandas de expressão está intrinsecamente ligada às fases da segmentação, sendo esta associada ao padrão estabelecido pelos genes *pair-rule* entre a fase pré-celularização e pós-celularização. Esta formação pode ser também subdividida em três fases: fase um, em que há a transição entre a expressão de genes *gap* para a expressão de genes *pair-rule* primários, que apresentam uma estrutura bem organizada, e o início da expressão de genes *pair-rule* secundários, que não apresentam uma estrutura inicial bem definida; fase dois, onde os genes *pair-rule* primários e secundários passam a ser expressos de forma mais regular, sendo que as bandas apresentam periodicidade e sobreposição entre si; fase três, onde as bandas de expressão

sofrem alterações à sua estrutura durante a fase de gastrulação, sendo alterada de forma a dividirem-se em catorze bandas de expressão. Na fase final da expressão de genes *pair-rule* primários, a divisão das bandas de expressão em duas bandas de menor dimensão resulta na formação dos catorze segmentos presentes na fase final da segmentação<sup>126</sup>.

## **I.10.5 Segmentação durante a gastrulação**

### **I.10.5.1. Estabelecimento dos genes de polaridade segmentar**

A transição do embrião pré-gastrular para embrião em gastrulação é o processo mais importante no desenvolvimento deste. É através deste processo que por via de alterações na composição celular, da morfologia e da expressão destas células que o embrião desenvolve todas as estruturas necessárias para a sua viabilidade. Tão importante quanto a correta formação estrutural é a correta localização onde estas formações estruturais serão localizadas. Este correto posicionamento é obtido previamente pela cascata de interações obtido através da interação de genes maternos – genes *gap* – genes *pair-rule* primários – genes *pair-rule* secundários. Com o culminar da expressão destes genes *pair-rule* secundários, durante a gastrulação um novo grupo de genes é ativado, sendo este os genes de polaridade segmentar. Desta classe de genes, sabe-se que *engrailed*<sup>127</sup> e *wingless*<sup>127</sup> estão envolvidos no processo inicial da formação dos segmentos embrionários<sup>128</sup>, enquanto *hedgehog*<sup>129</sup>, *gooseberry*<sup>129</sup>, *armadillo*<sup>129</sup>, *cubitus interruptus*<sup>129</sup>, *dishivelled*<sup>130</sup> e *patched*<sup>131</sup> estão envolvidos na regulação estrutural dentro do território que perfaz cada parassegmentos.

A formação dos parassegmentos ocorre na transição entre a celularização e a gastrulação, estabelecidos pela padronização cíclica providenciada pela ação dos genes *pair-rule*. Esta transição ocorre, uma vez que a expressão dos genes *pair-rule* é transiente<sup>132</sup>.

A transição entre o padrão preestabelecido e os parassegmentos definitivos é obtido pela expressão inicial dos dois genes principais para este mecanismo, sendo eles *engrailed* e *wingless*.

### **I.10.6 Formação dos parassegmentos**

A formação dos parassegmentos ocorre pela expressão alternada dos genes *engrailed* e *wingless*. Esta expressão, que ocorre durante o desenrolar da gastrulação, é resultado da necessidade por parte do embrião de adquirir um mecanismo que lhe permita organizar e posicionar o local onde as estruturas anatómicas se formarão, uma vez que o padrão preestabelecido pelos genes *pair-rule* é perturbado pela movimentação celular observada<sup>128</sup>. A expressão de *engrailed* e *wingless*, apesar de simultânea, não ocorre co-localizada. A expressão será intercalada, sendo essa intercalação que leva à formação das zonas segmentares. No contexto do parassegmento em formação, *engrailed* forma o limite posterior do parassegmento<sup>133</sup>, enquanto *wingless* forma o limite anterior do parassegmento<sup>134</sup>. A expressão destes genes envolvidos na segmentação é promovida pela expressão de genes *pair-rule*, assim como da relação que estes genes de polaridade segmentar apresentam entre si.

A formação do parassegmento ocorre pela expressão inicial de *engrailed* (Figura 15). Este tem a sua expressão ativada pela ação dos genes *pair-rule*, nomeadamente pela expressão de *even-skipped* e *fushi tarazu*<sup>135</sup>. A expressão que estes dois genes *pair-rule* causam não é co-localizada, mas sim complementar. Isto implica que a expressão de *Engrailed* é realizada onde os locais das bandas de expressão de cada um destes dois genes ocorre.

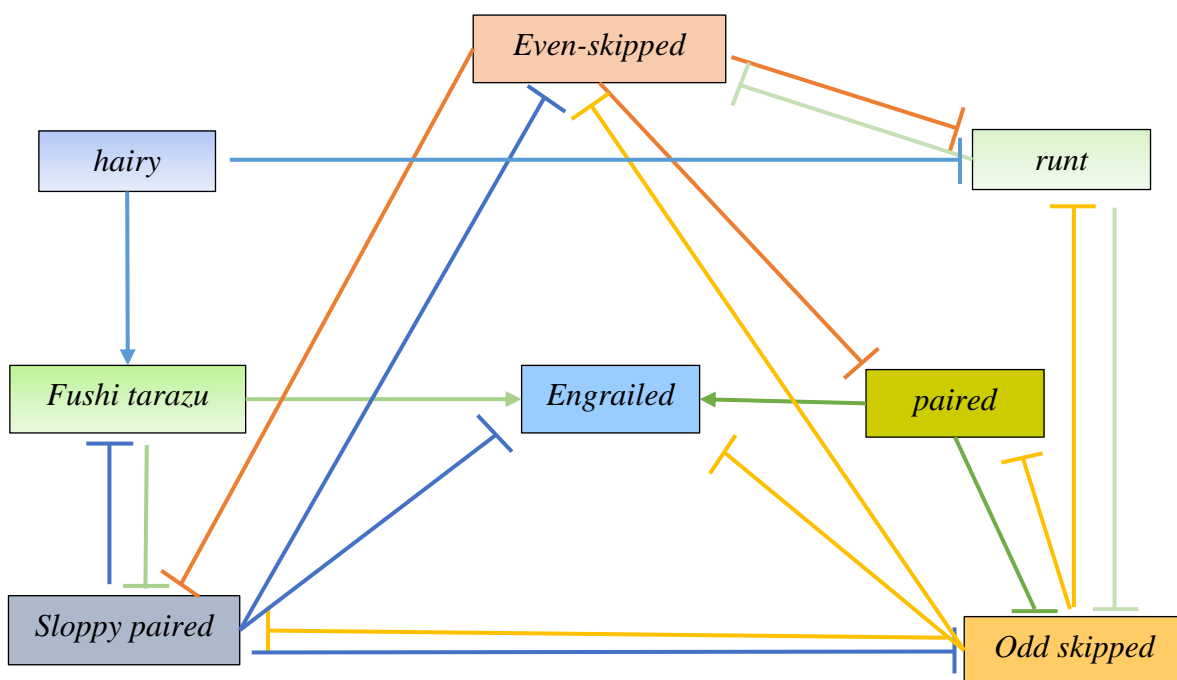


Figura 15 - **Esquema da regulação dos fatores envolvidos na regulação da formação de parassegmentos embrionários.** A formação dos parassegmentos é iniciada pela expressão de engrailed que, por interação com wingless, causa o estabelecimento de catorze parassegmentos que ditarão a posição correta da formação de estruturas anatómicas.

#### Ativação da expressão por ação de *Fushi Tarazu*

A expressão de *engrailed* por ação de *Fushi Tarazu* é resultado da interação direta da proteína deste com o promotor do gene que codifica a proteína *engrailed*. A interação entre estes fatores ocorre predominantemente no lado anterior do embrião, visto ser aqui que a expressão de *Fushi Tarazu* é mais intensa. *Fushi Tarazu* atua também de forma diferente da que *Even-Skipped* apresenta, sendo responsável pela expressão de *Engrailed* nos locais onde há parassegmentos pares<sup>123</sup>.

#### Ativação da expressão por ação de *Even-Skipped*

Contrariamente à ação direta apresentada pela expressão de *Fushi Tarazu*, que promove a transcrição de *engrailed* por controlo expressional baseado na sua concentração local, a expressão de *engrailed* por ação de *Even-Skipped* é mais complexa. Esta não ocorre por interação direta, mas pelo controlo deste de outros fatores que ativam e reprimem a expressão



de *engrailed*. *Even-Skipped* é responsável pela repressão de *fushi tarazu*, assim como de *odd-skipped*, *sloppy-paired*, *paired* e *runt*. Por sua vez, *Paired* é capaz de ativar a transcrição de *engrailed*. Isto implica que a presença de *Engrailed*, nos locais onde existe a influência de *Even-Skipped*, é conseguida pela organização dinâmica que este proporciona, ao inibir fatores envolvidos na repressão da expressão, mas ao também facilitar a expressão deste pela ativação de fatores envolvidos na transcrição de *engrailed*<sup>91,136</sup>.

Esta dupla ativação culmina no estabelecimento de catorze zonas cuja expressão de *engrailed* é observada, uma vez que este irá ser expresso a partir das sete bandas de *Even-Skipped* e das sete bandas de *Fushi Tarazu* expressas anteriormente. É com esta expressão de *Engrailed* que a expressão de *wingless* se irá iniciar.

### Expressão de *Wingless*

*Wingless* é outro dos genes de polaridade segmentar que é expresso durante a transição entre a fase final da celularização celular e o começo da gastrulação. A sua expressão é, por consequência, organizada também pela expressão dos genes *pair-rule even-skipped* e *fushi tarazu*. Neste caso, a transcrição de *wingless* ocorre nos locais onde a expressão destes genes não está presente<sup>128</sup>. No entanto, a expressão de *wingless* está associada à expressão de *engrailed*. A expressão de *Engrailed*, presente naquilo que será o limite posterior do parassegmento, ativa a expressão de *wingless* através da expressão de *hedgehog*, outro gene envolvido na formação dos parassegmentos. *Hedgehog* é expresso na forma de gradiente, sendo este gradiente responsável pela manutenção da transcrição continuada de *wingless* ao estabelecer uma relação regulatória contínua que mantém a transcrição de *wingless* (por via da sua expressão ser mantida por *hedgehog* ser expresso graças a *engrailed*) e *engrailed* ativas<sup>137</sup>.

#### **I.10.6.1. Consolidação dos limites interiores dos parassegmentos**

A formação dos parassegmentos é consolidada pela expressão dos marcadores que os delimitam posterior e anteriormente, sendo estes *Engrailed* e *Wingless*, respetivamente. Também é já está documentado que a manutenção da expressão destes dois fatores, inicialmente independente, torna-se co-dependente em fases mais tardias do desenvolvimento, sendo marcada pela formação de um sistema de *feedback* positivo mantido pela expressão de *Hedgehog*. No entanto,

não é só a expressão de *Hedgehog* que mantém este sistema no correto funcionamento. A expressão deste gene é mantida e permite manter também a expressão de outros genes de polaridade segmentar. Uma das formas pelo qual isto ocorre é através do refinamento com que *Hedgehog* é capacitado de ativar a expressão de *wingless*.

#### Controlo da expressão de *Wingless* por via da regulação de *Hedgehog*

Como já observado, a expressão de *Wingless* é realizada pela expressão de *Hedgehog*, mas esta expressão também precisa de ser a própria regulada. Tal regulação ocorre por via da ação de outros genes de polaridade segmentar, como *patched* e *cubitus interruptus*. A expressão inicial de *Hedgehog* ocorre inicialmente na mesma zona em que *engrailed* tem a sua expressão ativada. É a partir desta zona de maior expressão que a sua influência se alastra para as células da periferia, levando à expressão de *wingless*. No entanto, esta expressão não ocorre por interação direta, mas através de um fator intermediário, A esse fator intermediário dá-se o nome de *patched*<sup>137</sup>. Este fator *Patched* ativa também o fator *Cubitus Interruptus*. *Cubitus Interruptus* é o responsável não só pela manutenção da expressão de *Wingless*, assim como do controlo da expressão do próprio *patched*. A expressão destes fatores dinâmicos ocorre sob circunstâncias específicas. A sua expressão é encontrada em células presentes no interior do parassegmento em formação, estando a sua expressão localizada nas células que não apresentam nem expressão de *hedgehog*, nem de *engrailed*. A expressão aqui também é dinâmica, uma vez que a expressão de *Patched* causa a inibição da expressão de *cubitus interruptus*, mas *Hedgehog* inibe a capacidade inibitória de *Patched*. Isto causa uma regulação gradual da expressão, onde *Cubitus Interruptus* ativa a expressão de *wingless*, mas a sua expressão também é regulada tanto de forma positiva, como negativa, por *Patched*. *Patched* é por sua vez regulado por *Hedgehog*, que é regulado por *Engrailed*, tendo a sua expressão ativada por este, mas a sua capacidade inibitória reprimida também por via da expressão de *Engrailed*<sup>137</sup>.

A formação dos parassegmentos é a base pelo qual a formação dos planos segmentares que designarão o local onde cada estrutura específica será posteriormente formada, durante o período final da gastrulação e durante as fases posteriores. É também através da formação dos parassegmentos e dos posteriores segmentos que o destino celular das células presentes em cada um é decidido, assim como há a localização de onde as diferentes alterações morfológicas serão formadas.

## **I.11 Gene *hairy*, um gene *pair-rule* indispensável à organização embrionária**

O gene *hairy* é um gene presente em todos os organismos que apresentam uma fase de organização embrionária, onde este atua como um dos reguladores da expressão gênica. No modelo de *Drosophila melanogaster*, *Hairy* é expresso durante duas fases do desenvolvimento, sendo estas durante o desenvolvimento embrionário inicial, onde este atua como um gene *pair-rule* envolvido na coordenação da formação gradual dos parasegmentos, ao organizar a expressão dos fatores envolvidos na formação destes. Num período mais tardio, *Hairy* está também envolvido na formação do sistema nervoso periférico, ao coordenar a formação de estruturas associadas a este<sup>138</sup>.

*Hairy* é um gene que codifica uma proteína do tipo hélice-volta-hélice que atua como repressor de expressão de outros genes. É através deste mecanismo que a sua expressão permite que, durante o desenvolvimento embrionário, as bandas de expressão deste dos genes que são expressos na sua vizinhança sejam corretamente estabelecidos.

### **I.11.1 Expressão de *Hairy* durante o desenvolvimento embrionário**

Como já foi documentado anteriormente, a expressão de *Hairy* ocorre pela primeira vez durante a fase final do desenvolvimento do blastocisto sincicial. Durante esta fase, os genes *gap* anteriormente expressos estabelecem o padrão que ditará onde *hairy* e os restantes genes *pair-rule* serão expressos<sup>138</sup>. Com o iniciar da sua expressão, este irá gradualmente ocupar sete bandas de expressão, distribuídas ao longo de toda a superfície embrionária e no sentido antero-posterior. A regulação deste gene é, durante esta fase, dinâmica. Referente à sua expressão, *Hairy* tem a capacidade de alterar a expressão de outros genes que se encontrem na sua periferia, assim como este é capaz de ter a sua expressão alterada.

Na sua capacidade de ser um modelador da expressão de outros genes, *Hairy* é sobretudo importante na modelação do gene *pair-rule fushi tarazu*. Esta modelação é a mais importante durante esta fase do desenvolvimento, uma vez que é através da correta modelação da expressão de *Fushi Tarazu* que a posterior expressão gênica de elementos envolvidos na segmentação ocorre sem anomalias. Por outro lado, a correta expressão de *Fushi Tarazu* é também regulada graças ao correto estabelecimento dos locais de expressão que ditam onde *Hairy* está localizado.

A expressão de *Hairy* é controlada primeiramente pelo padrão formado anteriormente pelos genes *gap*, mas é igualmente controlado pela expressão de outros genes *pair-rule* que determinam a localização da sua expressão. esses genes são *even-skipped* e *runt*. Estes três genes, *Hairy*, *even-skipped* e *runt*, atuam por modelação própria e pela modelação que têm entre si.

*Hairy* tem a sua expressão ativada pela expressão de *even-skipped*, mas inibida pela expressão de *runt*. Por sua vez, *Hairy* ativa a expressão de *even-skipped* e inibe a expressão de *runt*. Como já afirmado, *hairy* também está envolvido na repressão da expressão de *fushi tarazu*<sup>139</sup>.

### **I.11.2 Controlo da expressão por parte de *Hairy***

*Hairy*, sendo um gene que codifica uma proteína com características que está associada a repressão, é capaz de influenciar a expressão de outros genes através da ação direta ou indireta que tem sobre os seus alvos. Apesar da sua função ser somente repressiva, este é capaz de indiretamente ativar a expressão de outros genes.

Através do uso destas propriedades, é observado na literatura que uma das formas como este gene altera a expressão de genes alvo é através da inibição direta que este causa no promotor do gene<sup>140</sup>. Nestes casos, *Hairy* é capaz de inibir a expressão do gene alvo, ao ser capaz de interagir com o promotor em si. Nesse sentido, esta particularidade torna-o um competidor pela interação com o promotor, não permitindo que este seja ativado.

Outro mecanismo pelo qual *Hairy* está envolvido na repressão da expressão é através da alteração da compactação da cromatina. Neste tipo de regulação, a proteína tem a capacidade de interagir com marcadores que regulam a abertura da cromatina. Ao interagir com os marcadores, quer por metilação/desmetilação ou por acetilação/desacetilação, este irá alterar as propriedades da própria cromatina. Este método de repressão é indireto, uma vez que não há uma repressão direta, mas sim uma repressão dos mecanismos que permitem a interação com o promotor de genes alvo, mantendo estes impossibilitados de terem interação<sup>141</sup>.

Outra forma pelo qual *Hairy* regula a expressão génica é pela sua interação indireta que promove a expressão de outros fatores. Apesar de ser um fator envolvido na repressão génica, este também está envolvido na ativação indireta da expressão génica de outros fatores, como é o caso de *even-skipped*. Este tipo de regulação indireta é alcançado através da regulação direta

de outros fatores que estão envolvidos na inibição da expressão do fator em si. Um exemplo deste mecanismo é a interação entre os três genes *pair-rule* *Hairy*, *even-skipped* e *runt*. Nesta dinâmica, a expressão de *even-skipped* é indiretamente promovida pela ação de *Hairy*, que ao ter uma repressão mútua com *runt* vai competir com este pela interação com *even-skipped*, promovendo a sua expressão<sup>139</sup>.

## **I 12 Hipótese e objetivo**

Na formulação da presente tese, foi estudada a organização e a expressão de genes *pair-rule*, assim como foi ponderado qual o mecanismo pelo qual essa organização ocorre. Esta regulação estudada, em particular a regulação realizada pelo gene *Hairy*, é importante pois a expressão do gene tem de ocorrer num local e tempo específico. Este controlo é realizado através do uso de mecanismos de regulação transcricional.

A regulação transcricional ocorre por diferentes vias, mas ocorre maioritariamente pela ação de ribonucleoproteínas, que são estruturas proteicas que apresentam a capacidade de se agregar a mRNAs que apresentem sequências específicas para a mesma<sup>142</sup>. Este mecanismo permite o reconhecimento de determinados fatores, permitindo que a sua localização ou expressão possa ser alterada.

Um exemplo deste mecanismo é apresentado pelo mecanismo envolvido na formação dos gradientes que regem a formação do eixo antero-posterior. Neste mecanismo, o mRNA que codifica para a formação de *oskar* no polo posterior é alcançado pela afinidade que este apresenta para com o polo negativo dos microtúbulos. A especificidade para o transporte por via de microtúbulos é também regulada por ação de fatores que regulam a capacidade de associação aos mesmos. Este mecanismo, no qual foi identificado a ação da ribonucleoproteína *Drosophila* Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (dFMR1), é um dos principais mecanismos pelo qual se dá a regulação. Esta proteína atua por ação direta, ao inibir a expressão da proteína de associação a microtúbulos *Putsch*, e por ação indireta, ao promover a expressão de RNAs de interferência (RNAi), que inibem a transcrição do mRNA alvo<sup>142</sup>.

Através de estudos realizados anteriormente com o intuito de observar possíveis interatores que interagissem com *Hairy1* no modelo de *Gallus gallus domesticus*, foi observada a interação de *Hairy1* com microtúbulos. Isto levantou a presente hipótese, que *Hairy* apresenta uma função conservada em *D. melanogaster*, sendo que a localização da sua expressão pode ser regulada

pelos mesmos mecanismos que abrangem outros, ou seja, que a localização da expressão de *Hairy* pode ser controlada pelo mesmo tipo de mecanismos que coordenam a expressão de outros genes com expressão espacial específica.

Para tal, este trabalho teve como objetivo validar um *stock* de *D. melanogaster* que apresenta um construto genómico contendo *Hairy* em fusão com GFP, associado a um promotor endógeno. Este *stock* foi adquirido por intermédio da *Bloomington Drosophila Stock center*, um consórcio especializado na criação e manutenção de variados tipos de *stock* diferentes de *Drosophila*.

A escolha deste modelo serviu para demonstrar, numa primeira instância, que:

- i) *Hairy-GFP* está presente numa linha de *D. melanogaster* recebida no laboratório
- ii) *Hairy-GFP* é expresso durante a embriogénese em *D. melanogaster*
- iii) *Hairy-GFP* comporta-se e forma bandas de expressão semelhantes às descritas para *Hairy* endógeno.

Trabalho posterior irá verificar a existência de uma interação entre a proteína *Hairy* e microtúbulos em *Drosophila* e caracterizar a sua relevância, tentando assim confirmar que esta proteína interage com microtúbulos.

## II Materiais e métodos

### II.1 Protocolo de cultura e manutenção de stocks

A manutenção dos *stocks* utilizados durante este trabalho foi realizada com temperatura controlada de 25°C, sob ciclo de exposição à luz natural. Os diferentes *stocks* foram mantidos em frascos de cultura contendo meio suplementado (farinha de milho, levedura, Agar-Agar, açúcar branco, água fervida, extrato de malte e niapagina). Os diferentes *stocks* foram mantidos em frascos de 23 milímetros diâmetro x 75 milímetros altura ou 48 milímetros diâmetro x 95 milímetros altura, de acordo com quantidade de espécimes que se pretendem obter.

Foram usadas três linhagens de *D. melanogaster* (tabela 1), onde cada uma apresentava características relevantes para a realização do trabalho experimental.

Tabela 1 - Stocks de *Drosophila melanogaster* utilizados durante o trabalho experimental

Nome abreviado	Genótipo	Origem
OR	Oregon-R (wild type)	Coleção do laboratório
Hairy-GFP	y[1]w[*];PBac{y[+mDint2]w[+mC]=hryEGFP.S}VK0003 7	Coleção do Laboratório
His2av-GFP	P{His2Av.GFP(S65T)}1	Coleção do laboratório

### II.2 Anestesia

Para a elaboração dos procedimentos experimentais a serem efetuados, os modelos animais tiveram de ser previamente selecionados e separados por sexo. Para tal, os modelos a selecionar foram primeiramente anestesiados através exposição ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo depois transferidos para o *flypad*. O *flypad* é constituído por uma superfície porosa ligada a um sistema fornecedor de CO<sub>2</sub> que emana CO<sub>2</sub> suficiente para manter os modelos num estado de

anestesia geral prolongado (Figura 16). Através da manutenção deste nível de anestesia é-se possível selecionar com segurança os modelos, sem ocorrer a possibilidade de os modelos poderem escapar.



Figura 16 - Equipamento utilizado para a seleção, tratamento e anestesia de *D. melanogaster*. Legenda: 1-Lupa; 2-Flypad; 3-Palheta de seleção?; 4- Injetor de CO2 (para garrafas); 5-Controlador de intensidade da luz; 6- Controlador da administração de CO2; 7- Mortuário dos espécimes; 8- Pedal de administração de CO2 para o flypad

### **II.3 Elaboração das placas de Petri revestidas**

A elaboração das placas revestidas inicia-se pela elaboração do meio de agar. Para tal, e para um volume total de 500ml, foi inicialmente pesadas 9,8g de Agar granulado da marca *NZYTech*. Quando corretamente pesado, este agar é então transferido para uma garrafa de 500ml e é-lhe adicionado 250ml de água destilada (dH<sub>2</sub>O). A mistura é então fervida, até se observar que o agar se dissolveu por completo. De seguida, deve ser adicionado 10g de açúcar comercial e 125ml de dH<sub>2</sub>O. Volta-se a ferver a mistura, havendo o cuidado para não caramelizar o açúcar. Sequencialmente, devem ser adicionados 125ml de sumo de maçã. A solução deve então ser deixada a arrefecer até apresentar uma temperatura aproximada de 50°C. quando esta temperatura é atingida, pode ser adicionado 5ml de nipagina (TEGOSEPT) 10%. Quando terminado, o agar pode ser colocado em placas de Petri, numa quantidade suficiente para cobrir toda a superfície basal da placa.



## II.4 Elaboração das cages para recolha de embriões

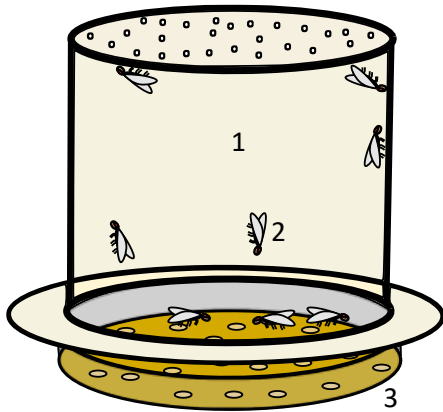


Figura 17 - **Esquema das cages usadas para recolha de embriões** Legenda: 1 - Cúpula de plástico; 2 - Modelo de *D. melanogaster*; 3 - Placa de Petri com meio de subsistência

A cage (Figura 17) é, na sua totalidade, composta por um meio de sustentação dos modelos e uma superfície delimitante para garantir que não há fuga dos modelos. Esta é construída sequencialmente após haver a seleção da quantidade e especificidade dos modelos a serem usados. A sua elaboração começa com a transferência dos modelos para a cúpula de plástico. Sendo esta transferência bem-sucedida, deve-se proceder à selagem da cúpula com recurso a uma placa de Petri revestida com gel de agar com aroma a fruta. Quando selada, a cage deve ser mantida imóvel e horizontalmente, até que os indivíduos colocados recuperem da anestesia.

## II.5 Seleção de embriões em estádios de desenvolvimento específicos

Antes da seleção dos embriões para estudo, foi decidido os embriões recolhidos apresentavam entre 1 e 3 horas de desenvolvimento:

Antes da seleção prévia dos embriões a serem usados nos processos experimentais, determinados passos necessitam de ser realizados, de forma a se obter uma coleção de espécimes com idades e características morfológicas uniformes. Primeiramente, depois de se proceder à substituição das placas colocadas antes do início do protocolo, estas terão de ser mantidas em incubação por um período de quarenta minutos, de forma a haver a certeza de que as fêmeas usadas irão depositar todos os embriões que possam ter retido devido à sobrelotação da placa anterior, levando a que todos os embriões posteriormente depositados tenham uma

idade mais uniforme. Após esse período de incubação de quarenta minutos, as placas são novamente trocadas e os espécimes são novamente postos em incubação, sendo nesta etapa incubados por um período total de três horas, mas repartido em duas fases: uma fase de deposição ativa de embriões por parte das fêmeas durante duas horas, sendo que após estas duas horas as placas são trocadas e estas são incubadas separadamente; uma fase de maturação de uma hora, onde os embriões se irão desenvolver. Isto permite que todos os embriões usados tenham uma idade relativa de no mínimo uma hora e no máximo três horas. Isto irá também permitir que todos os embriões usados tenham entre sete e catorze ciclos mitóticos nucleares.

## **II.6 Protocolo de descorionação**

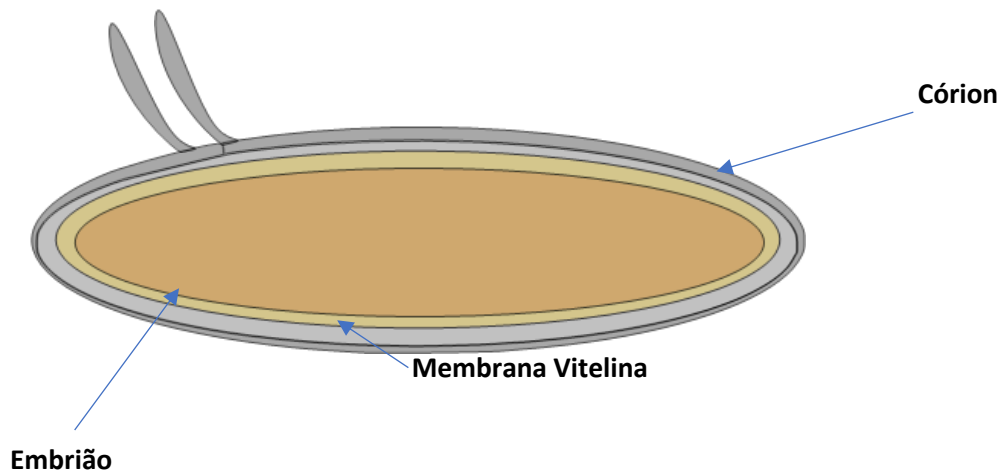


Figura 18 - **Representação esquemática de um embrião completo.** Este é constituído por três partes principais: Córion (cinzento); Membrana vitelina (amarelo); embrião (amarelo-torrado)

Este protocolo tem como finalidade a remoção bem-sucedida da camada de proteção mais externa do embrião, também denominada por *córion* (Figura 18), sem que haja danos associados ao embrião em si. O processo baseia-se num processo sucessivo de lavagens cuja função é, respetivamente: lavagem do embrião; descorionação com uso de produtos capacitados de dissolver o córion; lavagens sucessivas com o objetivo de remover vestígios do meio de remoção do córion. Neste sentido, o processo pode ser representado por:

- Lavagens dos embriões numa solução de Tween 0.1%;
- Secagem dos embriões num meio absorvente;

- Lavagem intermediária num recipiente com água, de forma a diluir ao máximo vestígios de Tween que possam ter permanecido após secagem;
- Nova secagem dos embriões;
- Lavagem numa solução com 1,75% de hipoclorito de sódio. É no presente passo que se dá a descalcificação do córion e de sua conseqüente remoção;
- Três lavagens sucessivas, de forma a diluir e eliminar quaisquer vestígios de hipoclorito de sódio que possam ainda não ter sido eliminado.

## **II.7 Protocolo de fixação**

Após o processo de descorionação, deve-se proceder à realização de um protocolo de fixação, de forma a preparar os embriões recolhidos para a o protocolo de Staining.

Após serem lavados e descorionados, os embriões devem ser transferidos para um frasco de vidro, com uma solução de 2,23ml PEM (pipes, glucose, EGTA, MgSO<sub>4</sub>, Triton X-100, H<sub>2</sub>O)+ 0,270ml formaldeído 37% + 2,5ml heptano.

Os embriões descorionados são fixados com incubação à temperatura ambiente, durante vinte e cinco minutos e com agitação. Os embriões são depois recolhidos para a remoção da membrana vitelínica (desvitelinização).

## **II.8 Protocolo de desvitelinização manual dos embriões de Drosophila**

Após o processo de fixação, os embriões são recolhidos e depositados num papel de filtro Whatman. Esse papel de filtro permite a evaporação mais eficaz do heptano.

Quando se observar que os embriões estão devidamente secos, estes devem ser transferidos para uma fita-cola de dupla face em que uma das faces está colada a uma placa de Petri. Tal transferência deve ser feita pressionando os embriões cuidadosamente contra a fita-cola, de forma a finalizar a transferência. Aquando da transferência esteja concluída, os embriões devem ser submersos numa solução de PBS 1x. De seguida, os embriões devem ser desvitelinizados manualmente, com o auxílio de uma lupa. A desvitelinização é realizada através da inserção de um objeto perfurante (normalmente uma agulha) entre a membrana vitelina e o embrião, de

forma a separar ambas as partes. Um embrião separado de forma bem-sucedida irá desagregar da membrana e flutuar no meio de PBS, enquanto a membrana continuará colada à fita-cola. Após todos os embriões terem sido extraídos com sucesso, estão são recolhidos para um tubo Eppendorf e preparados para *Staining*.

## **II.9 Protocolo de desvitelinização com recurso a metanol**

O protocolo de desvitelinização com recurso a metanol é um processo em que a membrana vitelina é retirada através de lavagens sucessivas com diferentes concentrações de metanol. Nesse sentido, o protocolo é iniciado imediatamente ao final do protocolo de fixação dos embriões. Quando acabada a fixação, a fase mais densa (correspondente à solução de PEM/Formaldeído) deve ser extraída, deixando a menor quantidade possível deste. Quando retirado, deve ser adicionado 2,5ml de metanol à solução. Depois de se adicionar o metanol, o frasco deve ser vigorosamente agitado por um minuto. Isto irá causar a rotura da membrana vitelina, levando ao afundamento do embrião. Quando terminada a agitação, os embriões acumulados no fundo devem ser recolhidos e transferidos para um Eppendorf. Quando colocados no Eppendorf, o meio em que estão suspensos deve ser retirado e deve ser substituído por 1ml de metanol 100%. Esta suspensão deve ser então posta em agitação durante 5 minutos, sendo repetida um total de três vezes. Depois destas três lavagens, o meio deve ser retirado e devem ser feitas três lavagens de 5 minutos com soluções de metanol:PBT (PBS+Triton X-100) com proporções:

- 3:1 metanol:PBT (PBS+Triton X-100);
- 1:1 metanol:PBT (PBS+Triton X-100);
- 1:3 metanol:PBT (PBS+Triton X-100)

Quando terminada a última lavagem, o meio com metanol:PBT de proporção 1:3 deve ser retirado e três lavagens com PBT devem ser feitas, tendo estas uma duração de 5 minutos cada. No final da última lavagem o PBT é extraído e deve ser adicionado 1ml de PBS e 1µl de DAPI, de forma a ser realizado o protocolo de *staining*.

## **II.10. Protocolo de *Staining***

Após extração e recolha dos embriões, estes são submetidos a um processo de *Staining*. Para tal, é primeiramente retirado o PBS 1x proveniente do meio da extração anterior, ao que é adicionado então 1ml de PBS 1x novo. Esta troca tem como objetivo os embriões ficarem num meio com volume e pureza determináveis.

Neste novo meio de PBS usado, é então adicionado 1 µl de marcador DAPI, ficando a solução total numa proporção volumétrica de 1:1000 µl de DAPI:PBS 1x. Devido ao DAPI ser facilmente degradável quando exposto a uma fonte luminosa, todo o processo de lavagem a seguir à adição deste deve ser realizada sem a presença de quaisquer fontes luminosas. A lavagem deve ser então realizada de forma coberta, de forma a não permitir a presença de fontes luminosas, durante 15 minutos no mínimo.

Durante este processo o DAPI, um marcador que intercala com *DNA*, procede à marcação gradual das zonas ricas em Adenina-Tiamina do *DNA*, facilitando assim a posterior observação deste. Passado o tempo mínimo necessário para uma marcação homogénea, é terminada a lavagem e os Eppendorfs são retirados. Destes Eppendorfs o PBS é então retirado, tendo cuidado para não haver perda de embriões. De seguida, um meio de preparação das lâminas é preparado. Para tal, é adicionado um meio de preparação DAKO. Este meio é então colocado e com o auxílio de uma pipeta dá-se a ressuspensão dos embriões neste meio de forma cuidadosa, de forma a não criar bolhas de ar.

Aquando da completa ressuspensão dos embriões no meio DAKO, toda a suspensão é então transferida e cuidadosamente colocada numa lâmina, de forma a novamente prevenir a criação de bolhas de ar que possam ficar retidas na lâmina. O meio é então fixado na lâmina com a aplicação da lamela e deixado então a secar. A amostra é também posteriormente selada, de forma a promover uma maior preservação dos espécimes. Após todos estes procedimentos, a amostra estará pronta para ser analisada com recurso a microscopia.

## **II.11 Protocolo de *immunostaining***

Este protocolo é iniciado de forma semelhante a outros anteriores, sendo a descorionação e fixação semelhantes às anteriormente apresentadas. Nesse sentido, após a fixação ser realizada,

é extraído todo o meio presente, sendo este substituído por uma solução de heptano:metanol de proporção 1:1. Esta deve ser agitada até se comprovar que todos os embriões se encontram depositados no fundo do frasco. Quando todos estiverem depositados, devem ser recolhidos e transferidos para um Eppendorf. Deve-se proceder a três lavagens sucessivas destes embriões num meio de metanol 100%, tendo cada lavagem uma duração de 5 minutos. Após estas três lavagens, os embriões devem ser reidratados, através de lavagens sucessivas, com duração de 5 minutos cada, em:

- Metanol:PBT, com proporção de 3:1;
- Metanol:PBT, com proporção de 1:1;
- Metanol:PBT, com proporção de 1:3;
- PBT.

No final da última lavagem, deve ser retirado o PBT e deve ser adicionado 1ml de PBT (Triton X-100) de concentração 0,5%. Este deve ser posto em agitação durante um período de 1-2h. Quando terminado, este PBT deve ser retirado e deve ser adicionado 1ml de SDS 0,5%, deixando a incubar em agitação por 1 minuto. Quando terminado, retira-se rapidamente o meio de SDS 0,5% e são realizadas duas lavagens sucessivas e rápidas dos embriões com PBT 0,5%. De seguida, o meio da última lavagem é retirado e substituído novamente por PBT 0,5%, sendo estas lavagem feita durante 5 minutos em agitação constante. Quando terminada a lavagem, o meio é retirado e substituído por um 1 ml de meio de bloqueio. Este é constituído por:

- 50 µl de *Donkey serum* (DS);
- 25 µl de BSA ;
- 925 µl de PBT 0,5%.

Devem ser adicionados 300µl de meio de bloqueio aos embriões e devem ser postos a lavar sob agitação durante 1-2h. Quando terminado, deve ser adicionado 1µl de anticorpo primário, diluição 1:200 , e esta deve ser deixada em incubação durante 16-24h, a 4°C e em agitação constante. Terminada esta incubação, o meio deve ser retirado e devem ser realizadas três lavagens com PBT 0,5%, sempre sob agitação e com duração de 20 minutos. O meio deve também ser trocado entre lavagens. No final da terceira lavagem, o meio deve ser trocado por 300µl de meio de bloqueio com a presença de 1µl de anticorpo secundário, e deve ser incubado sob agitação por 1-2h. a partir desta lavagem, todo o processo deve ser realizado sob a menor presença de luz possível. Terminada a lavagem com o anticorpo secundário, o meio de bloqueio deve ser substituído por PBT 0,5% e devem ser realizadas três lavagens sucessivas, com

agitação e com duração de 20 minutos. Terminadas as três lavagens, o meio deve ser substituído por PBS e devem ser feitas duas lavagens de 5 minutos, com agitação constante. Por fim, este PBS deve ser trocado e uma última lavagem com PBS deve ser feita. Terminada a lavagem, deve ser montada a lâmina.

## **II.12 Análise por microscopia e tratamento de resultados**

Este protocolo pode ser separado em duas partes: análise e coleção de resultados através de análise com recurso a microscopia e tratamento dos resultados obtidos através do uso de *software* adequado. A observação foi possível através do uso de um microscópio *Zeiss Imager Z2 w/ motorized stage*, suportado por meios visuais e computacionais. Isto permite uma melhor análise dos embriões preparados, assim como das suas propriedades que são de interesse. Após ser determinado que um embrião é considerado de interesse, uma foto representativa deste é efetuada para posterior análise e tratamento. Este procedimento é efetuado o número de vezes necessário, com todas as ampliações consideradas relevantes.

## **II.13 Tratamento de imagens**

Aquando do término da aquisição das imagens pretendidas, deve-se proceder ao tratamento destas, de forma a melhorar e tornar mais perceptível as qualidades de interesse. Todo este processo foi realizado no *software* “*Fiji ImageJ*”. Isto é alcançável através da atribuição de canais cromáticos representativos dos fluoróforos usados, sendo estes um canal azul, representativo da expressão de DAPI; e um canal verde, representativo da coloração associada à presença da proteína GFP associada à proteína de fusão *Hairy-GFP*.

Após esta escolha, a intensidade do sinal é então regulada em ambos os canais e o seu resultado é guardado, para haver uma análise detalhada de cada um separadamente. Estes serão também tratados e escalados de forma que a sua apresentação seja uniformizada. Quando todos os passos anteriores estejam concluídos, dá-se a junção das imagens obtidas de todos os canais, de forma a se obter uma imagem completa. A esta imagem são também adicionadas escalas e uniformização, conforme as anteriores. No final, todas as imagens devem ser guardadas em conformidade do desejado.

## II.14 Protocolo de *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

Para a realização do protocolo de PCR foi, antes de se proceder ao protocolo em si, predeterminado qual o fragmento de DNA a ser amplificado, assim como foram selecionados os reagentes usados na reação de mistura da amplificação.

Nesse sentido, tivemos de primeiro identificar os *primers* que permitiram a amplificação do genoma desejado. Estes *primers* foram identificados como *GFPP<sub>w</sub>158-AAGTTCATCTGCACCACCGG* para a cadeia *antisense* e *GFPR<sub>v</sub>461-CGTTCTTCTGCTTGTCGGCC* para a cadeia *sense* do DNA.

Com a identificação dos *primers*, foram reunidos todos os constituintes a serem usados na reação de mistura da amplificação.

Para um volume total de 25 µl por tubo estes foram:

- *Buffer* 10x – 2,5µl
- MgCl – 1,5 µl
- DNTP – 0,5 µl
- Primer forward – 0,5 µl
- Primer reverse – 0,5 µl
- DNA – 1 µl
- H<sub>2</sub>O – 18,25 µl
- Taq (NZYTaq II DNA polymerase) – 0,25 µl

Este volume foi repetido um total de sete vezes, um por cada uma das amostras analisadas.

Destes, todos os reagentes foram adicionados conforme a sequência apresentada, sendo a polimerase Taq adicionada no final da mistura. De seguida, esta mistura foi homogeneizada em cada um dos tubos e colocada no termo ciclador.

Neste, as amostras expostas a ciclos de replicação nas seguintes condições:

- 95°C – 3 minutos
- 94°C – 30 segundos
- 53°C – 20 segundos
- 72°C – 20 segundos



- 72°C – 10 minutos
- 4°C – até retirado

Destes, a sequência de temperaturas entre 94°C – 30 segundos, 53°C – 20 segundos e 72°C – 20 segundos é repetida trinta e cinco vezes, uma vez que é durante este ciclo que se dá a replicação do *DNA* de interesse. No final dos trinta e cinco ciclos, este passa por um período de estabilização final a 72°C por 10 minutos e é posteriormente conservado a 4°C até ser usado. Quando terminado, as amostras estão prontas para ser analisadas.

### **II.15 Protocolo de preparação do gel de agarose a 1%**

Para a preparação do gel, foram reunidos os seguintes reagentes:

- 0,6g de agarose
- 60 ml de 1x TAE Buffer
- 5µl GreenSafe *DNA* staining

A preparação do gel inicia-se com a adição da agarose ao meio tampão TAE. Quando adicionado, este deve ser aquecido e agitado, devendo ter-se em atenção para que a agarose fique totalmente dissolvida. Quando se observe que esta se encontra totalmente dissolvida, deve-se deixar arrefecer e deve ser adicionado o marcador de *DNA*, agitando levemente para que este seja homogeneizado.

De seguida, este deve ser posto num recipiente adequado, sendo também colocado um pente com o número de poços desejado. Deixa-se arrefecer até solidificar por completo.

Quando terminado, o pente deve ser retirado e este deve ser transferido para uma tina de eletroforese.

## **II.16 Preparação da eletroforese**

Na tina de eletroforese, o gel deve ser submerso em 1xTAE Buffer, até que se encontre submerso. Neste, devem ser adicionados a ladder e os sete produtos analisados. Estes foram adicionados na seguinte ordem:

- ladder
- Controlo negativo
- Controlo positivo
- Réplica 1
- Réplica 2
- Réplica 3
- Réplica 4

Em todos os poços, foi adicionado 24 µl de amostra, mais 1 µl de *DNA loading dye*. Quando adicionada, a tina deve ser fechada e os elétrodos colocados no local correto. Deixa-se correr as amostras durante um período de 90 minutos a uma voltagem de 90-100 V. Retirar quando as bandas se apresentarem expressas.

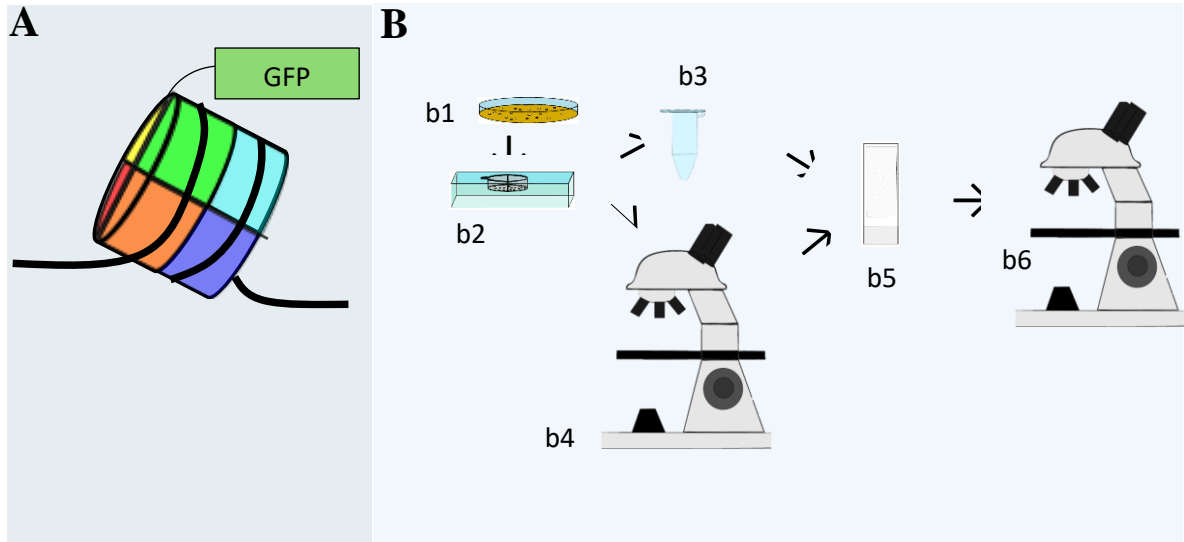
### **III Resultados**

#### **1. Otimização de um protocolo para observação de proteínas em fusão com GFP em embriões de *Drosophila* após fixação química.**

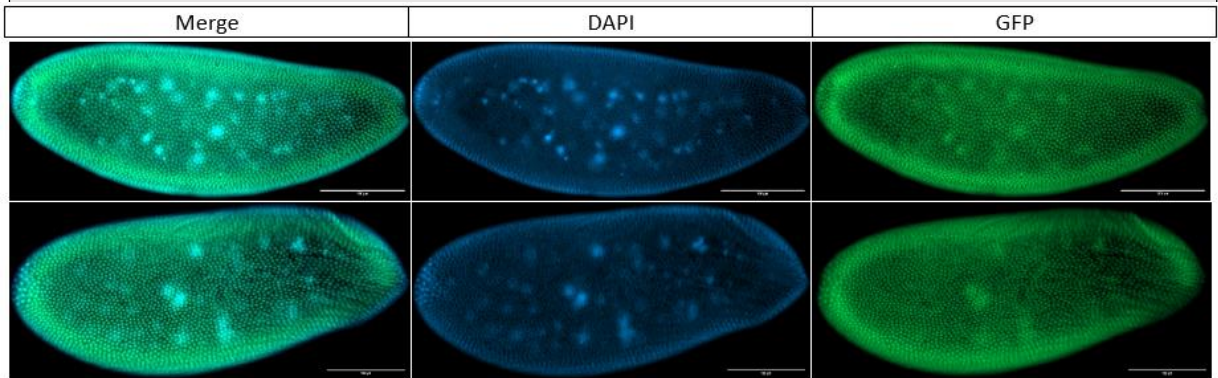
Para a realização deste trabalho, foi-nos necessária a aplicação de protocolos que permitissem a correta observação de uma proteína em fusão com GFP em microscopia de fluorescência. Para tal, começamos a testar um protocolo que permitisse a observação em embriões de *Drosophila* de proteínas em fusão com GFP após fixação química. Resultados anteriores indicavam que era possível observar proteínas em fusão com GFP em ovários de *Drosophila* após fixação com formaldeído<sup>143</sup>. No entanto observação de proteínas em fusão com GFP em embriões implica etapas adicionais como a remoção da membrana vitelina. A remoção da membrana vitelina é habitualmente removida após incubação com metanol o que pode levar a desnaturação de GFP.

Para verificar se era possível observar proteínas em fusão com GFP em embriões de *Drosophila* após fixação química recolhemos embriões depositados por fêmeas do stock P{His2Av.GFP(S65T)}1. Este stock expressa histona 2Av em fusão GFP (His2Av-GFP) (Figura 19A) cuja expressão é estável e a localização é bem definida. Fixamos com formaldeído e testamos dois protocolos de desvitelinização diferentes. Num dos protocolos a membrana vitelínica é removida por dissolução com metanol, no outro protocolo a membrana vitelina é removida manualmente, ao estereoscópio e com a ajuda de fórceps (ver material e métodos) (Figura 19B).

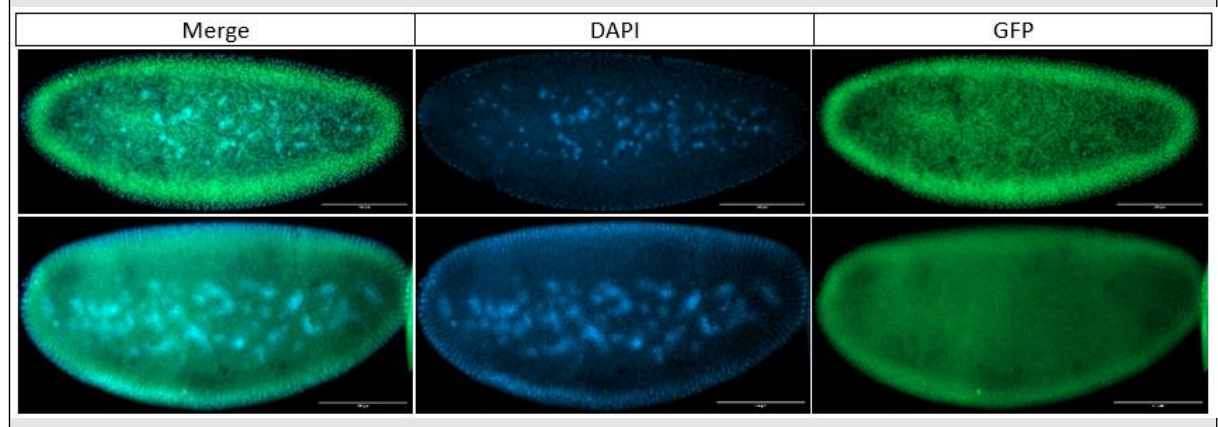
Os resultados obtidos parecem indicar que é possível observar His2Av-GFP com os dois protocolos, no entanto desvitelinização manual permite aquisições de imagens por microscopia de fluorescência de maior qualidade (Figura 19C,D)



**C** Desvitelinização manual



**D** Desvitelinização com metanol



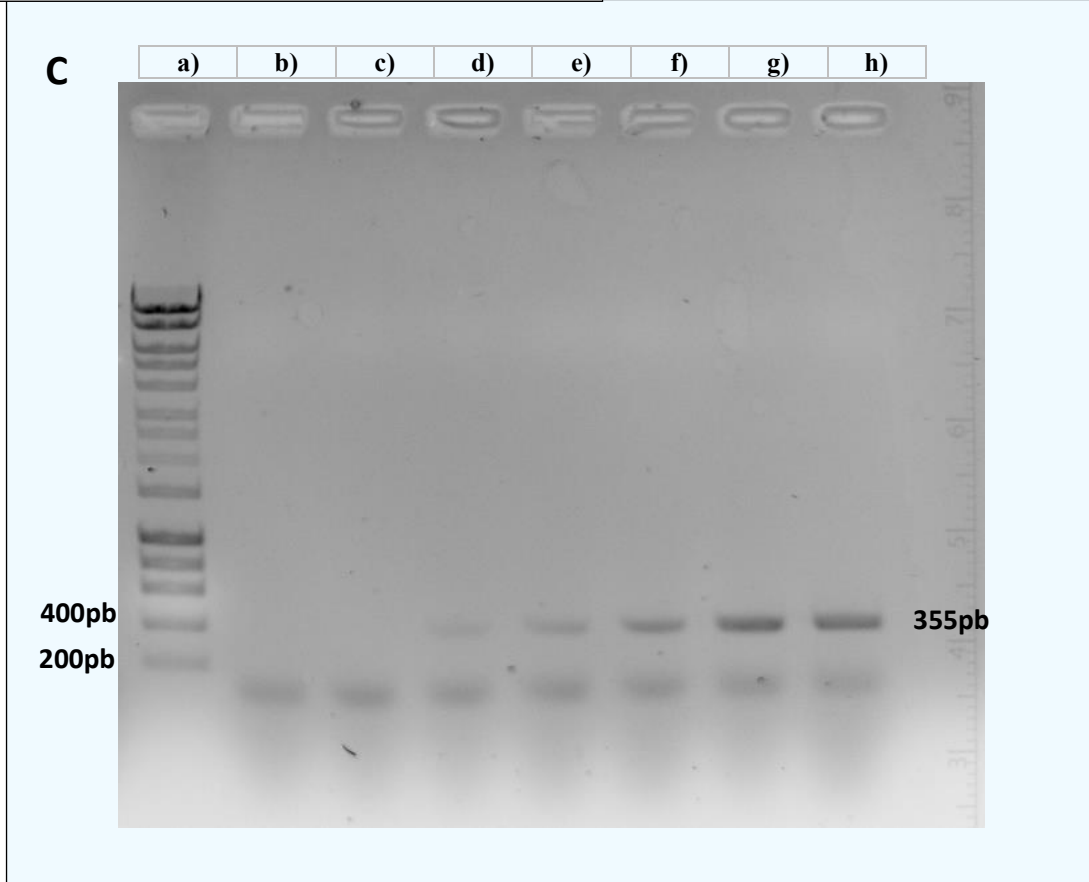
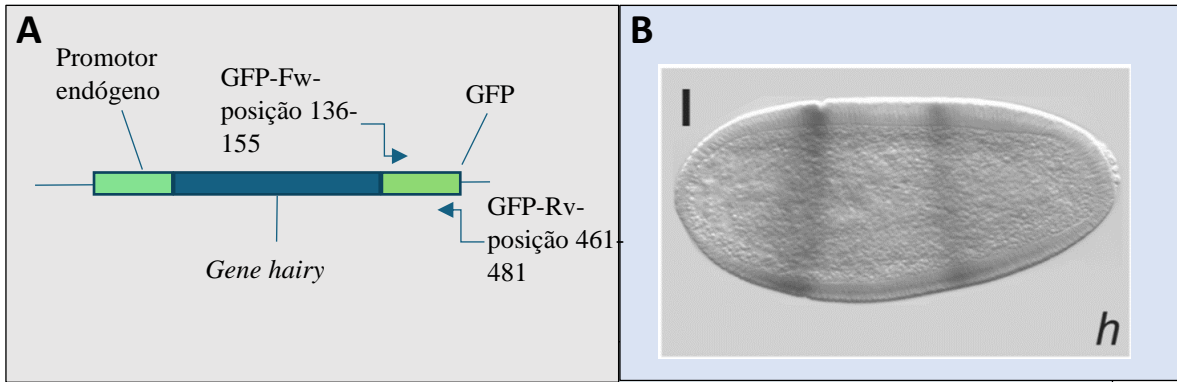
**Figura 19 - Análise comparativa entre protocolos de desvitelinização química e desvitelinização manual de embriões de *D. melanogaster*.** (A) Representação esquemática da histona2Av com GFP; (B) Representação esquemática dos protocolos utilizados. legenda: b1 – recolha dos embriões, b2 – descorionação química e fixação com formaldeído, b3 – desvitelinização por metanol, b4 – desvitelinização manual, b5 – montagem, b6 – análise ao microscópio; (C) Embriões com idade de 120 minutos, fixados com formaldeído, desvitelinizados manualmente e marcados com DAPI, provenientes de fêmeas com genótipo his2Av-GFP. (D) Embriões com idade entre 100 e 120 minutos, fixados com formaldeído, desvitelinizados por exposição química e marcados com DAPI, provenientes de fêmeas com genótipo his2Av-GFP. Escala: 100  $\mu$ m

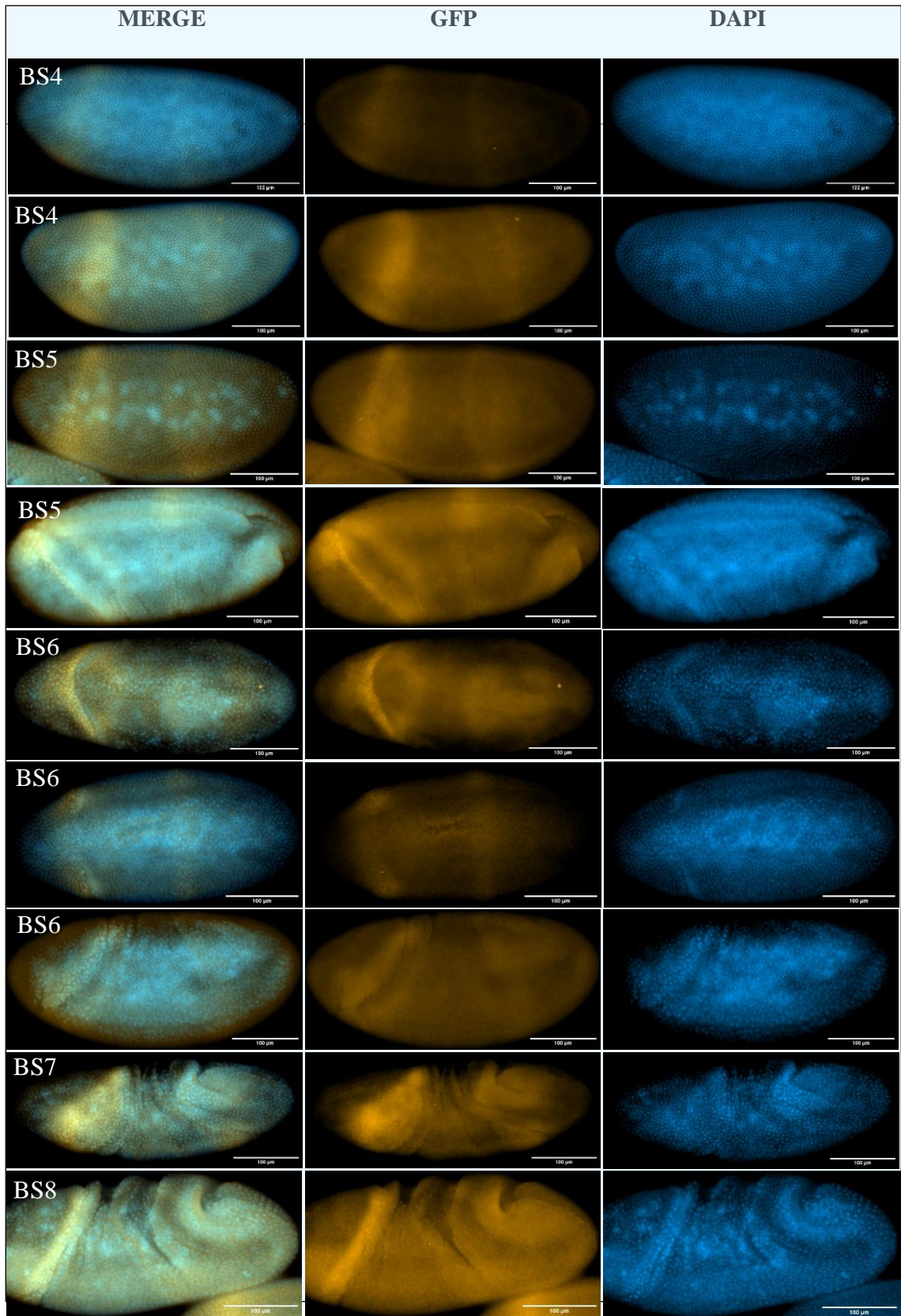
## **2. Confirmação da inserção de *Hairy*-GFP no genoma de um *stock* de *Drosophila*.**

Num estudo anterior realizado por *Vencem et al. 2009*, foi criado um construto contendo a sequência genômica do gene *Hairy* de *Drosophila*, incluindo o seu promotor, em fusão com a proteína GFP (Figura 20A). Este construct foi depois inserido no cromossoma 3 utilizando o P(acman) BAC library system, que permite a recombinação genética e a integração mediada pela integrase  $\Phi$ C31 em locais específicos attP, garantindo a inserção de grandes fragmentos genômicos no genoma de *Drosophila*. No mesmo trabalho foi demonstrado expressão de *Hairy*-GFP durante o desenvolvimento do embrião de *Drosophila* por imunohistoquímica (Figura 20B). O *stock* criado por esses investigadores está disponível no *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC) com o número 30876 e foi encomendado para a realização deste trabalho.

Uma vez recebido o *stock* de *Drosophila* com *Hairy*-GFP no laboratório começamos por verificar se o *stock* estava correto confirmando a presença de *Hairy*-GFP por análise PCR. Para tal extraímos *DNA* utilizando o kit Kapa express de quatro machos do *stock* e primers específicos para a sequência de *DNA* de GFP (Figura 20C). Adicionalmente usamos de *DNA* extraído de *stock* OR como controlo negativo e *stock* P{His2Av.GFP(S65T)}1 como controlo positivo. Os resultados mostram uma banda de tamanho aproximado de 350 pares de bases que era o tamanho esperado em todos os machos testados (poços *e* e *h*) no controlo positivo (poço *d*) mas não no controlo negativo (poço *c*) (Figura 20C). No controlo negativo do PCR (poço *b*) também não foi detetada nenhuma banda.

A confirmação da presença da banda por via de PCR nos machos testados permitiu a confirmação da presença de *Hairy*-GFP no *stock* usado. Seguindo essa conclusão, foi analisado se este se encontrava expresso também durante o período embrionário. Para tal, foi realizada uma marcação da presença de GFP por via de análise imunofluorescência. Esta foi realizada em embriões com idades entre 120 e 210 minutos pós ativação e conforme os protocolos estabelecidos. Neste protocolo, foram aplicados dois anticorpos com função específica, sendo o anticorpo primário IgG de coelho anti-GFP e o anticorpo secundário de morganho anti anticorpo IgG primário de coelho conjugado com Cy3. A visualização dos resultados da marcação (Figura 20D), através do uso do microscópio *de fluorescencia*, permitiu observar que a expressão de GFP está presente durante o período embrionário, corroborando os resultados obtidos por PCR.



**D**



**Figura 20 - Confirmação da expressão de Hairy-GFP na linha de Drosophila utilizada.**

**A** – Representação esquemática do construct genómico de *Hairy-GFP* inserido na linha de *Drosophila* (BL30876; yw; PBac-hry-EGFP) com a indicação dos primers utilizados para confirmação da sua presença no *stock*.

**B** – Padrão de expressão esperado para a proteína GFP de acordo com resultados anteriores (Venken et al., 2009).

**C** – Confirmação da presença do construct *hairy-GFP* no *stock* utilizado, através de análise por PCR. Legenda: **a)** – marcador de peso molecular; **b)** – controlo negativo de PCR; **c)** – controlo negativo do modelo - *stock* OR; **d)** – controlo positivo - *stock* P{His2Av.GFP(S65T)}1; **e)** – yw; PBac-hry-EGFP – réplica 1; **f)** – yw; PBac-hry-EGFP – réplica 2; **g)** – yw; PBac-hry-EGFP – réplica 3; **h)** – yw; PBac-hry-EGFP – réplica 4.

**D.** Confirmação da expressão de Hairy-GFP na linha utilizada através de análise por imunostaining com recurso a marcação com anticorpo  $\alpha$ -GFP em embriões com estadios de desenvolvimento compreendidos entre 4 e 8 na categorização de Bownes (BS).

### **3. Observação da expressão de Hairy-GFP no stock de Drosophila selecionado**

Através dos protocolos escolhidos, fomos analisar a expressão de *Hairy-GFP* durante o desenvolvimento embrionário em *D. melanogaster* durante os ciclos mitóticos finais, celularização e gastrulação. Para tal, fomos observar a expressão do gene em embriões com idades compreendidas entre 80 e 180 minutos pós ativação do embrião, tendo sido adquiridos embriões com divisões nucleares compreendidas entre nove e catorze. Foram também observados e adquiridos embriões com idade superior, encontrando-se já em gastrulação (Figura 21). Nesta aquisição de embriões, podemos observar a correta expressão de *Hairy-GFP*, com este a ter a sua expressão iniciada na altura correta (Figura 21, C13/14) e mantendo-se expresso ao longo do desenvolvimento posterior.

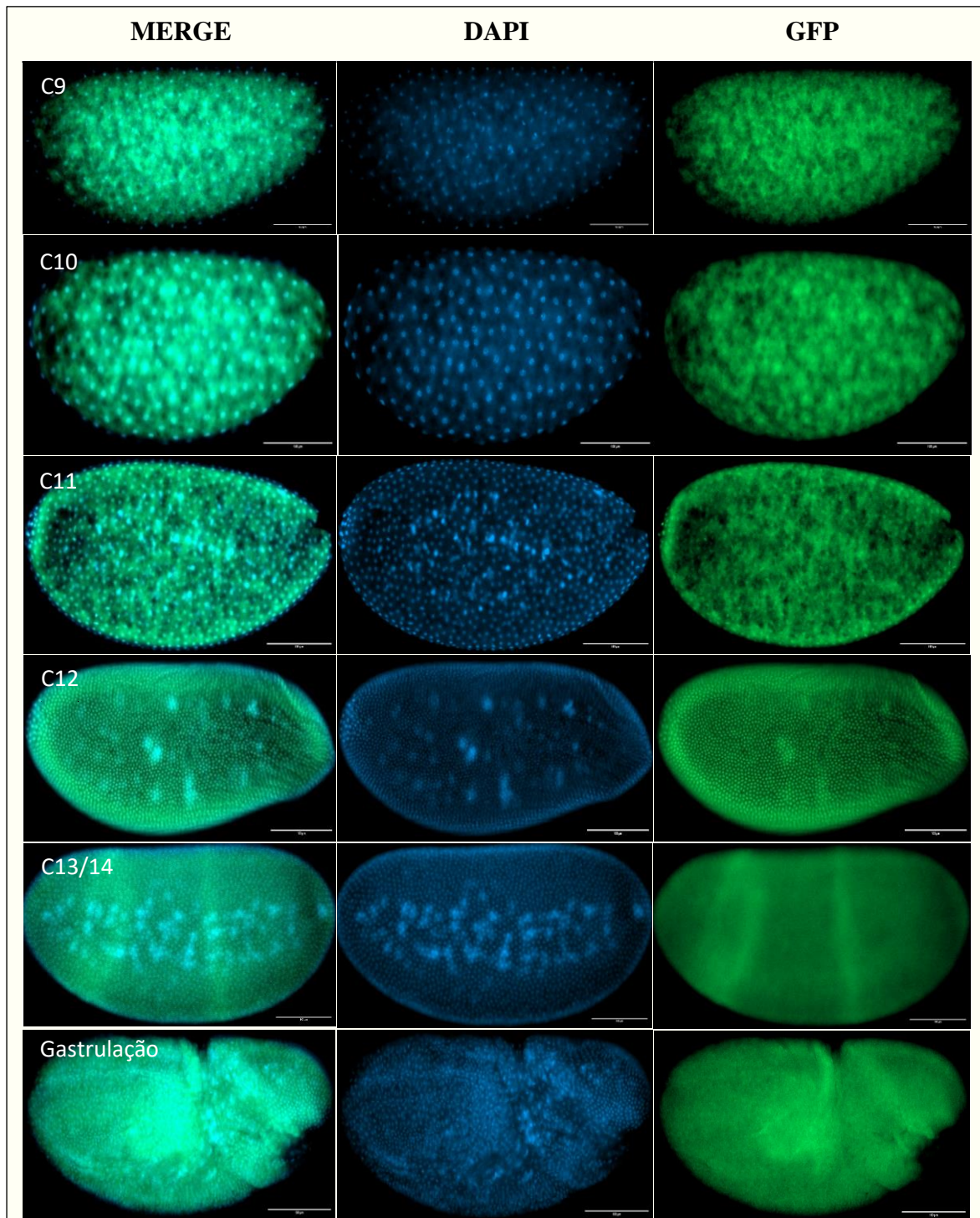


Figura 21 - Análise da localização de Hairy-GFP durante o desenvolvimento primário de *D. melanogaster*, com idades compreendidas entre 80 e 180 minutos pós-fertilização. Os embriões foram fixados com formaldeído, desvitelinizados manualmente e marcados com DAPI. Os embriões resultam de fêmeas com fenótipo hairy-GFP, regulados por promotor endógeno. A expressão de hairy-GFP não é visível antes da transição entre o ciclo 13 e o ciclo 14. Escala:100µm.

## **IV Discussão**

Todo o projeto de tese presentemente elaborado foi concebido com o intuito de averiguar se *Hairy*, um gene que presente tanto em vertebrados como em invertebrados, se encontra corretamente expresso no *stock* de *D. melanogaster* selecionado no período anterior à celularização.

Através de resultados anteriormente observados noutros modelos animais, foi observada uma interação entre *Hairy* e microtúbulos, pelo que foi inquirido se tal propriedade se encontra conservada entre espécies. Através desta análise, foi posta a hipótese que esta constituiria mais um dos mecanismos pelo qual há a regulação genica através de *Hairy*. No entanto esta correlação não foi ainda confirmada, necessitando que haja um estudo mais aprofundado da possível interação. Também podemos observar e comprovar que o *stock* de interesse com o constructo de *Hairy*-GFP apresenta condições para que seja usado no estudo dessa possível correlação entre *Hairy* e microtúbulos.

### **1. Otimização de um protocolo para observação de proteínas em fusão com GFP em embriões de *Drosophila* após fixação química**

A otimização dos protocolos usados para a obtenção da expressão de *Hairy*-GFP ao longo do desenvolvimento embrionário pré-gastrulação foi um dos pontos principais que estabelecemos antes da aquisição dos resultados. Para tal, selecionamos os protocolos que apresentaram melhor qualidade final dos embriões obtidos. Foi selecionado um protocolo de descorionação química, um protocolo de fixação dos embriões com recurso a solução PEM/formaldeído e heptano, um protocolo de desvitelinização, um que permitiu a coloração dos núcleos embrionários através de DAPI e um de montagem dos resultados na lamina de observação, através da aplicação de agente quelante DAKO (Figura 19B).

Destes protocolos, a escolha do protocolo referente à remoção da membrana vitelina foi o que levantou mais questões, uma vez foram apresentados dois protocolos, cada um com as suas características distintas. Um dos protocolos apresentava a remoção da membrana vitelina por ação manual e o outro realizava a mesma finalidade, mas por ação de metanol. Ambos os

protocolos que escolhemos foram adaptados a partir de protocolos presentes na literatura, sendo otimizados para as características apresentadas pelo *stock* escolhido<sup>144,145</sup>.

Como o *stock* de interesse ainda não tinha sido comprovado como viável, a otimização foi feita com o uso de um modelo de características semelhantes, o P{His2Av.GFP(S65T)}1 (Figura 19A). este modelo selecionado apresenta um constructo de GFP associado à subunidade 2AV do complexo das histonas, como mencionado anteriormente. Esta é uma das oito subunidades que constituem uma histona. A proteína GFP associada tem a particularidade de emitir um sinal luminoso quando excitada, permitindo identificar a sua localização precisa no interior do embrião. Isto é importante uma vez que as histonas têm como principal função a proteção e compactação do material genético presente no interior do núcleo. Apesar de a proteína de interesse não ter uma função ativa na expressão ou repressão génica, a sua localização é conhecida, permitindo a análise da qualidade da eficiência dos protocolos aplicados. Tal eficiência é obtida pela localização do sinal do fluoróforo e do marcador de *DNA* posteriormente aplicado durante o protocolo de *staining*.

A escolha de qual sequência de protocolos a ser usada (Figura 19B) foi feita através da visualização da qualidade dos resultados obtida pela realização de cada uma das variantes, realizadas de forma individual. De forma a estabelecer qual dos resultados apresentava melhor qualidade, foi analisada a integridade estrutural do embrião, assim como a especificidade do sinal.

Ambos protocolos diferem na forma como a membrana vitelina é extraída: no protocolo de remoção manual da membrana vitelina, esta é removida através do rompimento da membrana vitelina pela ação mecânica com recurso a fórceps; no protocolo de desvitelinização química a remoção é feita com recurso a metanol, sendo a membrana extraída pelo uso de álcoois que levam à permeabilização e consequente rutura da membrana por via de agitação mecânica vigorosa<sup>146</sup>.

No protocolo de desvitelinização manual, a extração ocorre por ação de forças mecânicas. Estes são primeiramente imobilizados, com a aplicação posterior de força mecânica que causa o rompimento da membrana, havendo a separação do embrião da membrana vitelina<sup>144</sup>.

No protocolo de remoção química por via de metanol, a extração é feita por consequência da ação que álcoois orgânicos causam na membrana vitelina<sup>146</sup>. Ao permeabilizar a membrana, esta fica mais suscetível a ser danificada por ações externas que possam causar a sua rutura.

Dos resultados obtidos, foi possível observar-se que ambos apresentam vantagens e desvantagens.

Na aplicação do protocolo de desvitelinização química, podemos observar um número maior de espécimes obtidos, mas com uma expressão do fluoróforo mais dispersa. Também observámos que o processo de tratamento é mais longo e não há a possibilidade de controlar ativamente a qualidade dos embriões. Também observámos uma qualidade menor dos resultados obtidos. Esta pode ser explicada pelas propriedades químicas apresentadas pelo meio usado.

Está descrito na literatura que o uso de álcoois na realização de protocolos, apesar de benéfica, tem problemas associados. O tipo de álcoois usados em meio laboratorial, em especial álcoois lineares como metanol, são ativamente responsáveis por degradação proteica, em particular de grupos proteicos de alta sensibilidade. Um desses tipos de proteínas altamente sensíveis são fluoróforos como GFP<sup>147</sup>. A interação entre ambos causa a degradação do sinal, diminuindo a sua especificidade.

Para termos uma comparação correta realizámos também o protocolo de desvitelinização manual. Este protocolo proporcionou uma marcação mais específica, assim como os embriões obtidos eram mais uniformizados. O tempo de realização do protocolo foi menor.

Contrariamente ao apresentado pelo protocolo de desvitelinização química, o número de embriões obtidos por desvitelinização manual estava dependente da qualidade da extração, sendo o seu número gradualmente maior. Este aumento está diretamente correlacionado com a proficiência na técnica de extração.

Tendo os resultados sido obtidos, fomos comparar a sua qualidade face ao tempo despendido para a sua obtenção.

Os embriões obtidos por desvitelinização manual foram, como já indicado, obtidos com uma taxa de sucesso inicialmente menor do que os obtidos através da desvitelinização química. Isto foi causado pelo facto de a técnica envolver uma maior necessidade de perícia na sua realização, uma vez que todo o processo de preparação e extração está dependente da ocorrência de erro humano. Os resultados obtidos por desvitelinização manual (Figura 19C) apresentam uma qualidade superior. Estes apresentam uma especificidade de sinal superior, assim como uma estrutura do embrião mais conservada face ao apresentado pelos embriões obtidos por tratamento com metanol.

Por sua vez, os resultados obtidos através da remoção da membrana vitelina por ação de metanol apresentaram uma proporção de amostras superior e mais variada.

Foi ponderado por nós que este resultado pode ser causado pela maior facilidade de transferência dos embriões ao longo da elaboração do protocolo, em que a probabilidade de ocorrer erro humano é menor. No entanto, estes apresentaram uma especificidade de sinal menor, assim uma menor integridade estrutural, quando comparados com modelos *wild type*.

Nos modelos em que foi usada a técnica de desvitelinização química, foi observado que o sinal emitido pela presença do fluoróforo apresentava-se sob uma forma mais difusa e inespecífica, implicando que o sinal sofreu alterações que ou causaram a perda da especificidade ou que uma alteração estrutural ocorreu e o sinal passou a ser difundido de maneira inadequada (Figura 19D).

A primeira opção implica que o sinal do fluoróforo tenha sido alterado. Como já observado, sabe-se que a presença de agentes que causem alterações na conformidade proteica são um dos fatores que podem influenciar a expressão das mesmas. Nesse sentido, a presença de uma exposição prolongada a álcoois orgânicos pode causar a desnaturação do fluoróforo, causando problemas associados à marcação que este transmite.

Simultaneamente, a ação que esses mesmo álcoois têm perante a integridade estrutural pode ser uma das causas. O tratamento com este tipo de álcoois causa uma desidratação global dos tecidos.<sup>148</sup>, ajudando na sua preservação. No entanto, este tipo de tratamento também está associado à alteração da estrutura interna do embrião, causando alterações na sua forma. Estas alterações causam modificações na forma de expressão do sinal.

Pela ponderação dos resultados obtidos e pela inquirição dos pontos que favoreceram cada um dos protocolos, foi acordado que o melhor protocolo a ser usado foi o protocolo com recurso a desvitelinização manual, uma vez que os seus resultados foram mais expressivos e nítidos, assim como a diferença que inicialmente se apresentou no número de espécimes recolhidos foi gradualmente diminuindo com o melhoramento da técnica de recolha usada.

Foi ponderada por nós a razão da discrepância da qualidade de sinal apresentada. Um dos mais prováveis fatores é o menor tempo de exposição a fatores que degradam o fluoróforo ao qual este foi sujeito. Isto leva a que a probabilidade de o sinal degradar diminua, conservando melhor a localização e eficiência do mesmo<sup>147</sup>.

Outra possível razão para a melhor qualidade é a permanência dos embriões numa solução isotónica durante a extração manual da membrana vitelina. A colocação dos embriões num ambiente estável em que não há a presença de agentes que possam deteriorar as estruturas internas do embrião após a fixação é um dos fatores pelo qual há a manutenção da integridade, não só estrutural do embrião, mas também dos componentes proteicos que este apresenta.

A aquisição destes resultados permitiu-nos selecionar, entre os dois protocolos de desvitelinização estudados, o protocolo de desvitelinização manual, por este apresentar melhor qualidade de resultados com menor tempo despendido e por uma complexidade de trabalho semelhante.

## **2. Confirmação da inserção de *Hairy-GFP* no genoma de um *stock* de *Drosophila*.**

Para obtermos a correta visualização da expressão de *Hairy-GFP* no *stock* de interesse, tivemos de confirmar a presença do constructo no modelo, tanto visualmente como por análise bioquímica. Para tal, foi feito um teste de PCR, de forma a confirmar a presença de mRNA que codificasse a proteína de interesse. Através do uso de *primers* específicos, foi possível expandir o genoma de interesse. A análise dos resultados obtidos durante o *cycling*, através da realização de PCR, foi analisada. Através deste foi possível observar que a expressão dos parâmetros de controlo ocorreu como esperado.

O marcador de peso molecular (Figura 20C-a) ficou estabelecido da forma como é apresentado na literatura. De igual modo, o controlo negativo (Figura 20C-b), *stock* OR, não apresentou bandas de expressão para o mRNA do constructo, indicando que este não apresenta a expressão do mesmo. Este resultado está em concordância para com as características do *stock* usado na literatura.

O controlo positivo selecionado (Figura 20C-c), *stock* P{His2Av.GFP(S65T)}1, apresentou uma banda de expressão de características semelhantes ao observado na literatura. Este *stock*, diferente do *stock* com o construto de interesse, apresenta também uma inserção que providencia a expressão de GFP. Este foi detetado com sucesso, sendo observado um fragmento com 355 pb de dimensão.

Os quatro poços com os *stocks* de interesse (Figura 20C-e,f,g,h) também apresentaram a expressão de bandas de expressão. Foi observado que as expressões provenientes das amostras

detinham todas um tamanho semelhante, sendo observado um fragmento com 355 pb de dimensão.

A expressão simultânea de uma banda correspondente à expressão de GFP em todos os modelos do *stock* de interesse, assim como a expressão de uma banda de semelhantes dimensões por parte do *stock* usado como controlo positivo, permitiu-nos concluir que a expressão de GFP se encontrava presente no *stock* de interesse. Por consequência, isto implica que no mesmo modelo de interesse o construto *Hairy*-GFP está presente, uma vez que a expressão de GFP está dependente da também presente expressão de *Hairy*.

De seguida, fomos verificar visualmente se a expressão era observada, em embriões do *stock* de interesse de *D. melanogaster*. Esta confirmação foi feita através do tratamento e análise da expressão por via da realização de um protocolo de *immunostaining*. Para tal, necessitamos primeiramente de verificar como este se encontra expresso.

Através da análise do estudo realizado por *Venken et al. 2009*, do qual este modelo foi originado, foi possível observar o padrão de expressão deste *stock*. Contrariamente à representação típica que é observada durante a fase final do blastocisto sincicial, onde o embrião apresenta a expressão de sete bandas de expressão, o modelo só apresenta duas (Figura 20B). No estudo realizado por Venken e associados, o *stock* por nós utilizado foi criado através da inserção de um construto, por via vetorial, no genoma de um modelo *wild type* de *Drosophila*. Este construto era composto por um promotor endógeno, uma cópia do gene *Hairy* e uma cópia do gene que codifica para *GFP*, diretamente conectada à zona terminal do gene *Hairy* e tendo o codão stop sido substituído por uma terminação proteica C-terminal (Figura 20A). Uma análise mais detalhada do mesmo estudo demonstra que a expressão das duas bandas é causada pela localização da inserção do construto. Este está localizado na área do genoma onde um promotor da expressão de *Hairy*, responsável pela expressão deste na primeira e quinta bandas, está localizado<sup>149</sup>. Por consequência desta localização, as bandas cujo construto é expresso serão igualmente a primeira e quinta bandas. Podemos observar também que a inserção apresentada no *stock* não afeta a expressão de outros genes envolvidos no processo gradual de padronização e segmentação.

Tendo sido observadas as características do *stock* usado, fomos confirmar se a expressão deste ia de acordo com o estudo que lhe deu origem. Para tal, realizámos uma aquisição de imagens do modelo durante o período de interesse, com recurso a técnicas de coloração imunohistoquímica. Para tal, os embriões recolhidos foram inicialmente tratados como



apresentado nos protocolos de descoronação química, fixação com recurso a PEM/Formaldeído e heptano, assim como a membrana vitelina foi extraída por via do uso de metanol. Estes foram sujeitos ao protocolo de *immunostaining* onde foram aplicados de forma sucessiva um anticorpo primário com afinidade para com GFP e um anticorpo secundário com afinidade para com o anticorpo primário. A interação destes anticorpos tem a particularidade de ativar um fluoróforo presente, permitindo a sua localização<sup>150</sup>. Com esta expressão extra, associada à já presente expressão de GFP do *stock*, este foi observado por microscopia eletrónica. Destes resultados (Figura 20D) foi observada marcação em embriões com idades iguais ou superiores a duas horas (estádio de Bownes 4: 120 minutos), mas com uma expressão superior em períodos pós as duas horas e dez minutos (estádio de Bownes 4-8). Este resultado está de acordo com o esperado.

Em modelos *wild type*, a expressão dos genes *pair-rule* primários, onde *Hairy* se insere, ocorre a partir do ciclo de replicação nuclear treze. Este ciclo, conforme o apresentado em estudos como o de *Foe et al, 1993*<sup>151</sup>, mostra que o início e refinamento da expressão de genes *pair-rule* ocorre durante o ciclo treze, aproximadamente no marco de 120 minutos após ativação do embrião. Através desta observação, em modelos *wild type*, assim como no *stock* usado, a expressão dentro do intervalo de tempo estabelecido para o modelo.

Foi também analisada a localização da expressão das bandas. Como já observado anteriormente, a expressão obtida a partir do *stock*, quando analisado por nós, demonstrou-se igual à apresentada nos estudos feitos por *Venken* e associados. No mesmo sentido, de forma a confirmar que não só este é expresso temporalmente como nos modelos *wild type*, foi analisado se a expressão é semelhante<sup>152</sup>. Através da visualização de diversos artigos em que é observada a expressão de *Hairy* em modelos inalterados, como o estudo realizado por *Tsai et al. 1994*<sup>113</sup>, é possível observar que a expressão no *stock* escolhido da primeira e da quinta banda de expressão ocorre no local e da maneira observada em modelos *wild type*.

Com esta concordância entre resultados do *stock* de interesse e de modelos *wild type*, foi possível confirmar que o *stock* apresenta as condições para ser usado na observação da expressão genica de *Hairy* ao longo da embriogénese.

### **3. Observação da expressão de *Hairy-GFP* no *stock* de *Drosophila* selecionado**

Após termos selecionado os protocolos que melhor permitiram a visualização da expressão no *stock* usado e comprovando que o *stock* apresenta características semelhantes às apresentadas no modelo *wild type*, foi inquirido como a expressão deste ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário. Para tal, fomos observar a expressão do construct. Antes da aquisição dos resultados, foi expectável que a expressão só fosse observável passados 120 minutos após ativação do embrião, como foi observado também durante a confirmação da viabilidade do *stock* através do protocolo de *immunostaining*. Para confirmação de que a expressão do construto não ocorre antes do esperado, foram também obtidas imagens de estadios mais precoces do desenvolvimento, sendo estes obtidos com idades compreendidas entre 70 e 130 minutos após a ativação dos embriões. Apesar de não se encontrar dentro do período pretendido para a análise da expressão antes da celularização, foi também observada a expressão deste durante a gastrulação.

Isto implica que os embriões escolhidos apresentam entre nove e catorze ciclos de divisão nuclear, assim como são apresentados embriões em gastrulação inicial até ao alongamento da banda germinativa<sup>153</sup>.

Destes resultados, foi observado que na oitava divisão nuclear (**C8**) é observado o início da migração gradual destes núcleos para a superfície. Como é possível observar-se na Figura 21

Na nona divisão nuclear (**C9**) podemos observar que os núcleos já se começam a instalar na periferia. É também durante este ciclo que, como observado em estudos de *Ali-Murthy et al. 2016*<sup>68</sup> e na literatura em geral, um gradiente antero-posterior de *Bicoid* é formado. Tal como esperado não observamos *Hairy-GFP*.

No décimo ciclo (**C10**) observámos que os núcleos já se encontram instalados junto à superfície do embrião. É também durante este ciclo que a expressão de genes *gap* é iniciada<sup>151</sup>, assim como é observável a presença de aglomerados celulares nos polos embrionários. É também durante este ciclo que as últimas divisões nucleares sincronizadas ocorrem. Como é expectável, não observámos a expressão de *Hairy-GFP*.

Durante o décimo primeiro e décimo segundo ciclos (**C11 a C12**) foi observado que os núcleos localizados à superfície continuaram a sua divisão acelerada, mas agora esta é mais irregular. Tal como observado na literatura, como nos estudos de *Jaeger 2011*<sup>69</sup> e *Tsai et al. 1994*<sup>113</sup>, a

expressão de genes *gap* tem a sua expressão mais acentuada. Também como esperado, não há a observação da expressão de Hairy-GFP.

No décimo terceiro ciclo (C13) começamos a observar a expressão de genes *pair-rule*, podendo esta ser observada através de bandas de expressão. É também durante este ciclo que a transição gradual da origem transcricional ocorre, havendo uma gradual substituição do controlo da expressão por parte de RNA materno para a origem transcricional embrionária.

Foi na transição do décimo terceiro para o décimo quarto ciclo (C14) que alterações na estrutura embrionária foram mais visíveis. Durante esta etapa, e antes do início da gastrulação, sabemos que a membrana externa sofre invaginações que resultam na individualização dos núcleos que se encontram junto à membrana celular, criando assim uma monocamada de células na superfície, a blastoderme<sup>154</sup>. É também durante esta etapa a transição da expressão de mRNAs maternos é substituída por completo pela expressão do genoma embrionário. Durante esta fase final do refinamento da expressão dos genes *pair-rule*, é observada a formação de células através do processo de celularização, onde os núcleos são envolvidos pela membrana celular e formam células individuais.

Com a finalização da celularização, o período de interesse para a observação da expressão do construto neste modelo terminou, mas foi de interesse para a compreensão do modelo a observação da expressão do construto durante a gastrulação. Foi observado que a expressão nestes embriões ainda se apresentava presente, mas que diminui gradualmente. Este ponto foi confirmado, através da análise do estudo de *Carroll et al. 1988*<sup>122</sup>.

Destes resultados, pudemos observar que a expressão do construto no *stock* de interesse está presente como foi esperado, sendo a sua expressão observada a partir dos 120 minutos pós ativação, como tinha sido hipotetizado. Isto demonstra que o *stock* pode ser usado para estudos posteriores da interação de Hairy com outros fatores circundantes. Estes resultados também permitiram confirmar que este é um modelo válido para o estudo do desenvolvimento embrionário.

## V Conclusão e perspectivas futuras

A realização deste projeto de tese permitiu em primeira instância confirmar a viabilidade do *stock y[1]w[\*];PBac{y[+mDint2]w[+mC]=hryEGFP.S}VK00037*, adquirido através da *Bloomington Drosophila Stock Center*. Através das diferentes abordagens experimentais realizadas de forma a comprovar a sua expressão, assim como a sua correta localização espacial e temporal, foi possível confirmar que este *stock* apresenta as condições necessárias para ser usado em estudos posteriores da relação de expressão e interação de *Hairy* com outros constituintes celulares no período entre o início da sua expressão e completa celularização nuclear.

Numa segunda instância da realização deste projeto, será inquirido se *Hairy* apresenta uma função conservada, sendo tal função em questão a possível interação deste com filamentos de microtúbulos. Esta interação foi verificada através de um teste *yeast two-hybrid* em modelos de *Gallus gallus domesticus* realizado anteriormente no laboratório, pelo que se postulou que tal interação pode ocorrer em *D. melanogaster*.

Para confirmar esta interação, será adequada a realização de protocolos que possam comprovar a existência e interações mútuas entre *Hairy* e microtúbulos. Tais protocolos, como a realização de *western blot* para confirmação bioquímica da presença, a visualização de embriões com recurso a *staining* imunohistoquímico que visem a marcação tanto do construto *Hairy-GFP* como de tubulina ou mesma realização de um teste *yeast two-hybrid* que comprove de igual forma a interação observada podem ser usados para confirmação desta interação.

## VI Bibliografia

1. Scott F Gilbert & Barresi Michael J. *Developmental Biology*. (2016).
2. Laver, J. D., Marsolais, A. J., Smibert, C. A. & Lipshitz, H. D. Regulation and Function of Maternal Gene Products During the Maternal-to-Zygotic Transition in *Drosophila*. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 113 43–84 (Academic Press Inc., 2015).
3. Alberts, B., Wilson, J. H. & Hunt, T. *Alberts Molecular Biology of the Cell 7th Edition*. (2022).
4. Li, L., Lu, X. & Dean, J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med* **34**, 919–938 (2013).
5. Moller, C. C. & Wassarman, P. M. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* **132**, 103–112 (1989).
6. Fahrenkamp, E., Algarra, B. & Jovine, L. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Mol Reprod Dev* **87**, 326–340 (2020).
7. Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M. & Dean, J. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *JouRNAI of Cell Biology* **197**, 37–44 (2012).
8. Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G. J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, 483–487 (2014).
9. Jones, K. T., Soeller, C. & Cannell, M. B. The passage of Ca<sup>2+</sup> and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* **125**, 4627–4635 (1998).
10. Swann, K. The role of Ca<sup>2+</sup> in oocyte activation during In Vitro fertilization: Insights into potential therapies for rescuing failed fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1865**, 1830–1837 (2018).
11. Fahrenkamp, E., Algarra, B. & Jovine, L. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Mol Reprod Dev* **87**, 326–340 (2020).
12. Siu, K. K., Serrão, V. H. B., Ziyat, A. & Lee, J. E. The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *JouRNAI of Cell Biology* **220**, (2021).
13. Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A. & Zoumpourlis, V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med* **38**, 979–986 (2016).
14. Gulyas, B. J. A reexamination of cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: Rotation of blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. *JouRNAI of Experimental Zoology* **193**, 235–247 (1975).
15. Kan, N. G. *et al.* Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophectoderm. *Development* **134**, 31–41 (2007).
16. Rossant, J. & Tam, P. P. L. Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Dev Cell* **57**, 152–165 (2022).

17. Rossant, J. Making the Mouse Blastocyst. in 275–288 (2016). doi:10.1016/bs.ctdb.2015.11.015.
18. Misra, J. R. & Irvine, K. D. The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu Rev Genet* **52**, 65–87 (2018).
19. Zhu, M. & Zernicka-Goetz, M. Principles of Self-Organization of the Mammalian Embryo. *Cell* **183**, 1467–1478 (2020).
20. O’Sullivan, C., Rancourt, S., Liu, S. & Rancourt, D. A novel murine tryptase involved in blastocyst hatching and outgrowth. *Reproduction* **122**, 61–71 (2001).
21. Negrón-Pérez, V. M. & Hansen, P. J. The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. *J Assist Reprod Genet* **34**, 725–731 (2017).
22. O’Sullivan, C. M., Liu, S. Y., Karpinka, J. B. & Rancourt, D. E. Embryonic hatching enzyme strypsin/ISP1 is expressed with ISP2 in endometrial glands during implantation. *Mol Reprod Dev* **62**, 328–334 (2002).
23. Ramathal, C., Wang, W., Hunt, E., Bagchi, I. C. & Bagchi, M. K. Transcription Factor CCAAT Enhancer-binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) Regulates the Formation of a Unique Extracellular Matrix That Controls Uterine Stromal Differentiation and Embryo Implantation. *JouRNAI of Biological Chemistry* **286**, 19860–19871 (2011).
24. Poh, Q. H., Rai, A., Salamonsen, L. A. & Greening, D. W. Omics insights into extracellular vesicles in embryo implantation and their therapeutic utility. *Proteomics* **23**, (2023).
25. Cuman, C. *et al.* Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success. *Human Reproduction* **28**, 1161–1171 (2013).
26. Gauster, M., Moser, G., Wernitznig, S., Kupper, N. & Huppertz, B. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **79**, 345 (2022).
27. Artus, J. & Chazaud, C. A close look at the mammalian blastocyst: epiblast and primitive endoderm formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 3327–3338 (2014).
28. Ghimire, S., Mantziou, V., Moris, N. & Martinez Arias, A. Human gastrulation: The embryo and its models. *Dev Biol* **474**, 100–108 (2021).
29. Deschamps, J. & van Nes, J. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* **132**, 2931–2942 (2005).
30. Komatsu, Y. & Mishina, Y. Establishment of left–right asymmetry in vertebrate development: the node in mouse embryos. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 4659–4666 (2013).
31. Tran, T. Q. & Kioussi, C. Pitx genes in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **78**, 4921–4938 (2021).
32. Zorn, A. M. & Wells, J. M. Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 221–251 (2009).
33. Noah, T. K., Donahue, B. & Shroyer, N. F. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* **317**, 2702–2710 (2011).
34. Chinoy, M. R. Lung growth and development. *Frontiers in Bioscience* **8**, 974 (2003).

35. Ten Have-Opbroek, A. A. W. Lung Development in the Mouse Embryo. *Exp Lung Res* **17**, 111–130 (1991).
36. Chung, W.-S., Shin, C. H. & Stainier, D. Y. R. Bmp2 Signaling Regulates the Hepatic versus Pancreatic Fate Decision. *Dev Cell* **15**, 738–748 (2008).
37. Corallo, D., Trapani, V. & Bonaldo, P. The notochord: structure and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**, 2989–3008 (2015).
38. Tam, Patrick P. L. & Trainor, Paula. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol (Berl)* **189**, (1994).
39. Windner, S. E., Bird, N. C., Patterson, S. E., Doris, R. A. & Devoto, S. H. Fss/Tbx6 is required for central dermomyotome cell fate in zebrafish. *Biol Open* **1**, 806–814 (2012).
40. Deschamps, J. & Duboule, D. Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the Hox clock. *Genes Dev* **31**, 1406–1416 (2017).
41. Baker, R. E., Schnell, S. & Maini, P. K. A clock and wavefront mechanism for somite formation. *Dev Biol* **293**, 116–126 (2006).
42. Bessho, Y. & Kageyama, R. Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 379–384 (2003).
43. Kelly, R. G., Buckingham, M. E. & Moorman, A. F. Heart Fields and Cardiac Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a015750–a015750 (2014).
44. Miquerol, L. & Kelly, R. G. Organogenesis of the vertebrate heart. *WIREs Developmental Biology* **2**, 17–29 (2013).
45. Nagai, H. *et al.* Early hematopoietic and vascular development in the chick. *Int J Dev Biol* **62**, 137–144 (2018).
46. Shin, M., Nagai, H. & Sheng, G. Notch mediates Wnt and BMP signals in the early separation of smooth muscle progenitors and blood/endothelial common progenitors. *Development* **136**, 595–603 (2009).
47. Nakazawa, F., Nagai, H., Shin, M. & Sheng, G. Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. *Blood* **108**, 3335–3343 (2006).
48. Davidson, A. J., Lewis, P., Przepiorski, A. & Sander, V. Turning mesoderm into kidney. *Semin Cell Dev Biol* **91**, 86–93 (2019).
49. Tsang, T. E. *et al.* Lim1 Activity Is Required for Intermediate Mesoderm Differentiation in the Mouse Embryo. *Dev Biol* **223**, 77–90 (2000).
50. Joseph, A., Yao, H. & Hinton, B. T. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Dev Biol* **325**, 6–14 (2009).
51. O’Brien, L. L. & McMahon, A. P. Induction and patterning of the metanephric nephron. *Semin Cell Dev Biol* **36**, 31–38 (2014).
52. Stemple, D. L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* **132**, 2503–2512 (2005).

53. de Bree, K., de Bakker, B. S. & Oostra, R.-J. The development of the human notochord. *PLoS One* **13**, e0205752 (2018).
54. Thawani, A. & Groves, A. K. Building the Border: Development of the Chordate Neural Plate Border Region and Its Derivatives. *Front Physiol* **11**, (2020).
55. Papanayotou, C. *et al.* A Mechanism Regulating the Onset of Sox2 Expression in the Embryonic Neural Plate. *PLoS Biol* **6**, e2 (2008).
56. Groves, A. K. & LaBonne, C. Setting appropriate boundaries: Fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev Biol* **389**, 2–12 (2014).
57. Dady, A., Havis, E., Escriou, V., Catala, M. & Duband, J.-L. Junctional Neurulation: A Unique Developmental Program Shaping a Discrete Region of the Spinal Cord Highly Susceptible to Neural Tube Defects. *The Journal of Neuroscience* **34**, 13208–13221 (2014).
58. Catala, M., Teillet, M.-A., Robertis, E. M. De & Douarin, N. M. Le. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* **122**, 2599–2610 (1996).
59. McShane, S. G. *et al.* Cellular basis of neuroepithelial bending during mouse spinal neural tube closure. *Dev Biol* **404**, 113–124 (2015).
60. Catala, M. Overview of Secondary Neurulation. *J Korean Neurosurg Soc* **64**, 346–358 (2021).
61. Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S. & Garesse, R. *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology. in 33–49 (2007). doi:10.1007/978-1-59745-365-3\_3.
62. Piper, M. D. W. & Partridge, L. Protocols to Study Aging in *Drosophila*. in 291–302 (2016). doi:10.1007/978-1-4939-6371-3\_18.
63. Bownes, M. A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **33**, 789–801 (1975).
64. Horner, V. L. & Wolfner, M. F. Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Developmental Dynamics* **237**, 527–544 (2008).
65. Kaneuchi, T. *et al.* Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 791–796 (2015).
66. Calzone, L., Thieffry, D., Tyson, J. J. & Novak, B. Dynamical modeling of syncytial mitotic cycles in *Drosophila* embryos. *Mol Syst Biol* **3**, (2007).
67. Swanson, M. M. & Poodry, C. A. Pole cell formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **75**, 419–430 (1980).
68. Ali-Murthy, Z. & Kornberg, T. B. Bicoid gradient formation and function in the *Drosophila* pre-syncytial blastoderm. *Elife* **5**, (2016).
69. Jaeger, J. The gap gene network. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 243–274 (2011).
70. Edgar, B. Parameters controlling transcriptional activation during early *drosophila* development. *Cell* **44**, 871–877 (1986).



71. Mazumdar, A. & Mazumdar, M. How one becomes many: Blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays* vol. 24 1012–1022 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bies.10184> (2002).
72. Schroeder, M. D., Greer, C. & Gaul, U. How to make stripes: Deciphering the transition from nonperiodic to periodic patterns in *Drosophila* segmentation. *Development* **138**, 3067–3078 (2011).
73. Riechmann, V. & Ephrussi, A. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 374–383 (2001).
74. Driever, W. & Nüsslein-Volhard, C. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**, 83–93 (1988).
75. Gavis, E. R. Pattern Formation: Gurken meets torpedo for the first time. *Current Biology* **5**, 1252–1254 (1995).
76. Derrick, C. J. & Weil, T. T. Translational control of gurken mRNA in *Drosophila* development. *Cell Cycle* **16**, 23–32 (2017).
77. Kugler, J.-M. & Lasko, P. Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly (Austin)* **3**, 15–28 (2009).
78. Forrest, K. M. & Gavis, E. R. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, 1159–68 (2003).
79. Niessing, D., Blanke, S. & Jäckle, H. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev* **16**, 2576–2582 (2002).
80. Micklem, D. R. mRNA Localisation during Development. *Dev Biol* **172**, 377–395 (1995).
81. Chang, C.-W. *et al.* Anterior–Posterior Axis Specification in *Drosophila* Oocytes: Identification of Novel bicoid and oskar mRNA Localization Factors. *Genetics* **188**, 883–896 (2011).
82. Wang, C. & Lehmann, R. *Nanos Is the Localized Posterior Determinant in Drosophila*. *Cell* vol. 66 (1991).
83. Papatsenko, D. & Levine, M. The *Drosophila* Gap Gene Network Is Composed of Two Parallel Toggle Switches. *PLoS One* **6**, e21145 (2011).
84. Baltruk, L. J., Lavezzo, G. M., Machado-Lima, A., Digiampietri, L. A. & Andrioli, L. P. An additive repression mechanism sets the anterior limits of anterior pair-rule stripes 1. *Cells and Development* **171**, (2022).
85. Finklstein, R. & Perrimon, N. The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* **346**, 485–488 (1990).
86. Wimmer, E. A., Simpson-Brose, M., Cohen, S. M., Desplan, C. & Jäckle, H. Trans- and cis-acting requirements for blastodermal expression of the head gap gene buttonhead. *Mech Dev* **53**, 235–245 (1995).
87. Walldorf, U. & Gehring, W. J. Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J* **11**, 2247–2259 (1992).
88. Ashyraliyev, M. *et al.* Gene Circuit Analysis of the Terminal Gap Gene huckebein. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000548 (2009).

89. Lardelli, M. & Ish-Horowicz, D. Drosophila hairy pair-rule gene regulates embryonic patterning outside its apparent stripe domains. *Development* **118**, 255–266 (1993).
90. Gutjahr, T., Frei, E. & Noll, M. Complex regulation of early paired expression: initial activation by gap genes and pattern modulation by pair-rule genes. *Development* **117**, 609–623 (1993).
91. Clark, E. Dynamic patterning by the Drosophila pair-rule network reconciles long-germ and short-germ segmentation. *PLoS Biol* **15**, (2017).
92. Struffi, P. *et al.* Combinatorial activation and concentration-dependent repression of the Drosophila even skipped stripe 3+7 enhancer. *Development* **138**, 4291–4299 (2011).
93. Small, S. & Levine, M. *The Initiation of Pair-Rule Stripes in the Drosophila Blastoderm. Current Opinion in Genetics and Development* vol. 1 (1991).
94. Graham, P. L., Anderson, W. R., Brandt, E. A., Xiang, J. & Pick, L. Dynamic expression of Drosophila segmental cell surface-encoding genes and their pair-rule regulators. *Dev Biol* **447**, 147–156 (2019).
95. Lim, B., Fukaya, T., Heist, T. & Levine, M. Temporal dynamics of pair-rule stripes in living Drosophila embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 8376–8381 (2018).
96. Stathopoulos, A. & Newcomb, S. Setting up for gastrulation: D. melanogaster. in 3–32 (2020). doi:10.1016/bs.ctdb.2019.11.004.
97. Leptin, M. *EMBO MEMBER'S REVIEW Gastrulation in Drosophila: The Logic and the Cellular Mechanisms. The EMBO Journal* vol. 18 (1999).
98. Gheisari, E., Aakhte, M. & Müller, H.-A. J. Gastrulation in Drosophila melanogaster: Genetic control, cellular basis and biomechanics. *Mech Dev* **163**, 103629 (2020).
99. Blankenship, J. T. & Wieschaus, E. Two new roles for the Drosophila AP patterning system in early morphogenesis. *Development* **128**, 5129–5138 (2001).
100. Leptin, M. Drosophila Gastrulation: From Pattern Formation to Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 189–212 (1995).
101. Vincent, A., Blankenship, J. T. & Wieschaus, E. Integration of the head and trunk segmentation systems controls cephalic furrow formation in Drosophila. *Development* **124**, 3747–3754 (1997).
102. Wang, Y.-C., Khan, Z., Kaschube, M. & Wieschaus, E. F. Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature* **484**, 390–393 (2012).
103. Takeda, M., Sami, M. M. & Wang, Y.-C. A homeostatic apical microtubule network shortens cells for epithelial folding via a basal polarity shift. *Nat Cell Biol* **20**, 36–45 (2018).
104. Hartenstein, V. & Campos-Ortega, J. A. Fate-mapping in wild-type Drosophila melanogaster. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **194**, 181–195 (1985).
105. Stathopoulos, A. & Newcomb, S. Setting up for gastrulation: D. melanogaster. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 136 3–32 (Academic Press Inc., 2020).
106. Yu, J. C., Balaghi, N., Erdemci-Tandogan, G., Castle, V. & Fernandez-Gonzalez, R. Myosin cables control the timing of tissue internalization in the Drosophila embryo. *Cells & Development* **168**, 203721 (2021).

107. Guo, H., Huang, S. & He, B. Evidence for a Role of the Lateral Ectoderm in Drosophila Mesoderm Invagination. *Front Cell Dev Biol* **10**, (2022).
108. Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. & Levine, M. dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **6**, 1518–1530 (1992).
109. Winklbauer, R. & Müller, H.-A. J. Mesoderm layer formation in Xenopus and Drosophila gastrulation. *Phys Biol* **8**, 045001 (2011).
110. Martin, A. C. The physical mechanisms of Drosophila gastrulation: Mesoderm and endoderm invagination. *Genetics* **214**, 543–560 (2020).
111. Bailles, A. *et al.* Genetic induction and mechanochemical propagation of a morphogenetic wave. *Nature* **572**, 467–473 (2019).
112. Vincent, B. J. *et al.* Hunchback is counter-repressed to regulate even-skipped stripe 2 expression in Drosophila embryos. *PLoS Genet* **14**, e1007644 (2018).
113. Tsai, C. & Gergen, J. P. Gap gene properties of the pair-rule gene runt during Drosophila segmentation. *Development* **120**, 1671–1683 (1994).
114. Hooper, K. L., Parkhurst, S. M. & Ish-Horowicz, D. Spatial control of hairy protein expression during embryogenesis. *Development* **107**, 489–504 (1989).
115. Riddihough, G. & Ish-Horowicz, D. Individual stripe regulatory elements in the Drosophila hairy promoter respond to maternal, gap, and pair-rule genes. *Genes Dev* **5**, 840–854 (1991).
116. Pankratz, M. J. & Jäckle, H. Making stripes in the Drosophila embryo. *Trends in Genetics* **6**, 287–292 (1990).
117. Hartmann, C., Taubert, H., Jäckle, H. & Pankratz, M. J. A two-step mode of stripe formation in the Drosophila blastoderm requires interactions among primary pair rule genes. *Mech Dev* **45**, 3–13 (1994).
118. Häder, T. *et al.* Activation of posterior pair-rule stripe expression in response to maternal caudal and zygotic knirps activities. *Mech Dev* **71**, 177–186 (1998).
119. La Rosee, A. Mechanism and Bicoid-dependent control of hairy stripe 7 expression in the posterior region of the Drosophila embryo. *EMBO J* **16**, 4403–4411 (1997).
120. Green, J. & Akam, M. Evolution of the pair rule gene network: Insights from a centipede. *Dev Biol* **382**, 235–245 (2013).
121. Carroll, S. B. & Whyte, J. S. The role of the hairy gene during Drosophila morphogenesis: stripes in imaginal discs. *Genes Dev* **3**, 905–916 (1989).
122. Carroll, S. B., Laughon, A. & Thalley, B. S. Expression, function, and regulation of the hairy segmentation protein in the Drosophila embryo. *Genes Dev* **2**, 883–890 (1988).
123. Kankel, M. W., Duncan, D. M. & Duncan, I. A Screen for Genes That Interact With the Drosophila Pair-Rule Segmentation Gene fushi tarazu. *Genetics* **168**, 161–180 (2004).
124. <https://www.sdbonline.org/sites/fly/segment/odd-skip.htm>.

125. Xue, L., Li, X. & Noll, M. Multiple protein functions of Paired in *Drosophila* development and their conservation in the Gooseberry and Pax3 homologs. *Development* **128**, 395–405 (2001).
126. Clark, E. & Akam, M. Odd-paired controls frequency doubling in *Drosophila* segmentation by altering the pair-rule gene regulatory network. *Elife* **5**, (2016).
127. Thieffry, D. Dynamical modelling of pattern formation during embryonic development. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 326–330 (2003).
128. Kornberg, T. B. & Tabata, T. Segmentation of the *Drosophila* embryo. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 585–593 (1993).
129. Perrimon, N. & Mahowald, A. P. Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol* **119**, 587–600 (1987).
130. Willert, K. Casein kinase 2 associates with and phosphorylates Dishevelled. *EMBO J* **16**, 3089–3096 (1997).
131. Hidalgo, A. & Ingham, P. *Cell Patterning in the Drosophila Segment: Spatial Regulation of the Segment Polarity Gene Patched*. *Development* vol. 110 (1990).
132. Lawrence, P. A. & Sampedro, J. *Drosophila* segmentation: after the first three hours. *Development* **119**, 971–976 (1993).
133. Howard, K. Regulatory interactions between the segmentation genes *fushi tarazu*, *hairy*, and *engrailed* in the *Drosophila* blastoderm. *Cell* **44**, 949–957 (1986).
134. Ingolia, N. T. Topology and Robustness in the *Drosophila* Segment Polarity Network. *PLoS Biol* **2**, e123 (2004).
135. Florence, B., Guichet, A., Ephrussi, A. & Laughon, A. Ftz-F1 is a cofactor in Ftz activation of the *Drosophila* *engrailed* gene. *Development* **124**, 839–847 (1997).
136. Peel, A. D., Chipman, A. D. & Akam, M. Arthropod Segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nat Rev Genet* **6**, 905–916 (2005).
137. Forbes, A. J., Spradling, A. C., Ingham, P. W. & Lin, H. The role of segment polarity genes during early oogenesis in *Drosophila*. *Development* **122**, 3283–3294 (1996).
138. Bianchi-Frias, D. *et al.* *Hairy* transcriptional repression targets and cofactor recruitment in *Drosophila*. *PLoS Biol* **2**, (2004).
139. Carroll, S. B. & Vavra, S. H. The zygotic control of *Drosophila* pair-rule gene expression: II. Spatial repression by gap and pair-rule gene products. *Development* **107**, 673–683 (1989).
140. Barolo, S. *hairy* mediates dominant repression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* **16**, 2883–2891 (1997).
141. Kok, K., Ay, A., Li, L. M. & Arnosti, D. N. Genome-wide errant targeting by *Hairy*. *Elife* **4**, (2015).
142. Wilhelm, J. E. & Smibert, C. A. Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* **97**, 235–252 (2005).
143. Feijão, T. *et al.* Polycomb group (PcG) proteins prevent the assembly of abnormal synaptonemal complex structures during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, (2022).

144. 'Sullivan, W., 'Ashburner, M. & 'Scott Hawley, R. '. *Drosophila Protocols*. (2000).
145. *Drosophila*. vol. 2540 (Springer US, New York, NY, 2022).
146. Mazur, P., Cole, K. W. & Mahowald, A. P. Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes. *Cryobiology* **29**, 210–239 (1992).
147. Maillard, J. *et al.* Universal quenching of common fluorescent probes by water and alcohols. *Chem Sci* **12**, 1352–1362 (2021).
148. Zucker, R. M. Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: Morphology and apoptosis. *Cytometry Part A* **69A**, 1143–1152 (2006).
149. Venken, K. J. T. *et al.* Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **6**, 431–434 (2009).
150. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P. & Yong, W. H. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. in 299–311 (2019). doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.
151. Foe, V. E. , O. G. M. and E. B. A. Mitosis and Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo, Chapter 3, figure 1. in *The Development of Drosophila melanogaster* (eds. M. Bate & A. Martinez-Arias) 154–155 (Cold Spring Harbor Press, 1993).
152. Ingham, P. W., Howard, K. R. & Ish-Horowicz, D. Transcription pattern of the *Drosophila* segmentation gene hairy. *Nature* **318**, 439–445 (1985).
153. Wotton, K. R., Jiménez-Guri, E., García Matheu, B. & Jaeger, J. A Staging Scheme for the Development of the Scuttle Fly *Megaselia abdita*. *PLoS One* **9**, e84421 (2014).
154. Kotadia, S., Crest, J., Tram, U., Riggs, B. & Sullivan, W. Blastoderm Formation and Cellularisation in *Drosophila melanogaster* . in *eLS* (Wiley, 2010). doi:10.1002/9780470015902.a0001071.pub2.