

Ana Catarina Silva Conceição

Elucidação do Papel de Brachyury na
Diferenciação de Distintas Linhagens Celulares:
Implicações na Tumorigénese



Faculdade de Medicina e de Ciências Biomédicas

2021

Ana Catarina Silva Conceição

Elucidação do Papel de Brachyury na
Diferenciação de Distintas Linhagens Celulares:
Implicações na Tumorigénese

Mestrado em Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Raquel P. Andrade

Professora Doutora Rute Moura



Faculdade de Medicina e de Ciências Biomédicas

2021

Título do trabalho: “Elucidação do Papel de Brachyury na Diferenciação de Distintas Linhagens Celulares: Implicações na Tumorigênese”

Declaração de autoria do trabalho: Declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

Copyright Ana Catarina Silva Conceição

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.

Agradecimentos

Assim chega mais uma etapa da minha vida ao fim e é neste momento que quero prestar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma a concretizá-la.

Obrigada à minha orientadora que me aceitou na sua equipa e me proporcionou esta oportunidade. A si, doutora Raquel, o meu grande obrigado pela ajuda, disponibilidade, simpatia e, acima de tudo, carinho. Sempre a conheci por ser uma professora exigente, mas muito prestável e, além disso se vir a confirmar depois de me incluir na sua equipa, também vim a descobrir a pessoa compreensiva e Humana que é.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório do Algarve, à Cristina, ao Tomás, ao Gil e à Ana Jesus que, além de tudo o que me ensinaram no laboratório e de todas as ideias científicas, tiveram sempre uma palavra amiga nos momentos de maior angústia que um aluno de mestrado sente. Agradeço-vos por tudo o que me ensinaram, mas sobretudo pela amizade e todo o apoio todos os dias.

Quero agradecer a oportunidade de ter ido três meses a Braga integrar a equipa da minha coorientadora, doutora Rute Moura. Consigo aprendi técnicas muito importantes para a realização da minha dissertação de mestrado, mas não só. Além de me ter recebido de braços abertos no ICVS e de me ter orientado longe de casa, ensinou-me que se trabalharmos a 200% também podemos ter direito ao nosso descanso. Quero agradecer todo o apoio que a doutora Goreti prestou durante a análises dos resultados na microscopia e todo o apoio e companheirismo dos meus colegas de laboratório, Henrique, Hugo, Carla, Daniela, Catarina, Raquel e Marcela.

Agradeço às equipas de laboratório do CBMR do doutor Rui Martinho, do doutor José Bragança, do doutor Clévio Nóbrega e do doutor Álvaro Tavares pelos materiais disponibilizados e por todo o auxílio prestado.

A título mais privado, quero agradecer à Rafaela, à Inês e, mais uma vez, à Cristina que foram as melhores colegas de casa que tive desde que iniciei esta caminhada académica. Foram a minha “família emprestada” quando estive longe de casa.

Aos meus “Amigos Locais” e às minhas amigas de berço, obrigada por estarem sempre presentes. A felicidade e a emoção são enormes sempre que nos reencontramos.

Ao meu João André, obrigada a ti pelo amor, pela amizade e por toda a cumplicidade. És um grande pilar na minha vida e sem o teu apoio incondicional nada disto teria sido fácil.

À minha família, mas em especial à minha Mãe, ao meu Pai, à minha Avó e ao meu Avô, que cuida de mim mesmo já não estando fisicamente presente, devo-vos o meu principal e maior obrigada. Sem vocês eu não seria a pessoa que sou hoje e não teria chegado onde cheguei nem terminado mais uma etapa de vida. Obrigada a todos do fundo do meu coração.

Quero dedicar este projeto a toda a comunidade científica. Orgulho-me do que aprendi até hoje sobre Ciência e ainda tenho esperança de que esta se torne na área reconhecida que tanto merece ser.

For graças às minhas orientadoras, aos meus colegas e aos meus amigos da área que encontrei a minha motivação. A vocês, presto a minha homenagem e deixo a minha palavra de apoio.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

Resumo

Brachyury é um fator de transcrição expresso muito cedo no desenvolvimento embrionário enquanto marcador dos precursores de mesendoderme. Este apresenta níveis elevados de expressão nos tecidos derivados da mesoderme, que diminuem e desaparecem à medida que as células se diferenciam em estruturas definitivas. De acordo com estes dados, verificou-se que em tumores de tecidos derivados da mesendoderme (como por exemplo, cancro da próstata e gastrointestinal), a presença de Brachyury está associada a um maior grau de indiferenciação celular, resultando em pior prognóstico, pior resposta terapêutica, maior recorrência e menor sobrevida. Inversamente, em tumores de tecidos derivados da neuroectoderme embrionária, tais como os gliomas, Brachyury comporta-se como um gene supressor tumoral, sendo um biomarcador independente de bom prognóstico e favorecendo a resposta terapêutica. O nosso grupo de investigação possui dados preliminares que demonstram a expressão de Brachyury associada à diferenciação do sistema nervoso central. Para além desses, outros dados do nosso grupo indicam que a proteína Hairy1, pertencente ao relógio molecular embrionário, não só co-localiza com o marcador mesodermal Brachyury (T) durante a gastrulação, como também interage fisicamente com esta proteína.

Neste trabalho, foi realizada uma caracterização da expressão de Brachyury e de Hairy1 no embrião de galinha em desenvolvimento, no tempo e no espaço por imunohistoquímica. Para além disso, a presença de Brachyury e Hairy1 na diferenciação da mesoderme e da neuroectoderme foi estudada através da deteção de isoformas ou de complexos proteicos diferentes por *western blot*. Os nossos resultados mostram que Brachyury e Hairy1 estão a ser expressos em tecidos neurais do embrião de galinha.

A elucidação do papel de Brachyury na diferenciação de cada linhagem celular irá contribuir para uma melhor compreensão dos processos tumorigénicos em que está implicado.

Palavras-chave: Brachyury, diferenciação, sistema nervoso central, Hairy1, tumorigénese.

Abstract

Brachyury is a transcription factor expressed very early in embryonic development as a marker of mesendoderm precursors. It shows high levels of expression in tissues derived from the mesoderm, which decrease and disappear as the cells differentiate into definitive structures. According to these data, it was found that in tumor tissues derived from the mesendoderm (such as prostate and gastrointestinal cancer), the presence of Brachyury is associated with a greater degree of cellular undifferentiation, resulting in worse prognosis, worse response treatment, greater recurrence and shorter survival. Conversely, in embryonic neuroectoderm-derived tissue tumors, such as gliomas, Brachyury behaves as a tumor suppressor gene, being an independent biomarker of good prognosis and favoring the therapeutic response. Our research group has preliminary data demonstrating Brachyury expression associated with central nervous system differentiation. In addition to these, other data from our group indicate that the Hairy1 protein, belonging to the embryo molecular clock, not only co-localizes with the mesodermal marker Brachyury (T) during gastrulation, but also interacts physically with this protein.

In this work, we performed the characterization of the expression of Brachyury and Hairy1 in the developing chicken embryo by immunohistochemistry. Furthermore, the presence of Brachyury and Hairy1 in the differentiation of mesoderm and neuroectoderm was studied through the detection of different protein isoforms or complexes by western blot. Our results show that Brachyury and Hairy1 are being expressed in chicken embryo neural tissues.

The elucidation of Brachyury's role in the differentiation of each cell line will contribute to a better understanding of the tumorigenic processes in which it is involved.

Keywords: Brachyury, differentiation, central nervous system, Hairy1, tumorigenesis.

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tecidos e órgãos que derivam a partir dos três folhetos germinativos durante o desenvolvimento embrionário	3
Tabela 2 - Incidência e mortalidade causadas por cancro previstas a nível global.	9
Tabela 3 - Classificação dos diferentes tipo de cancros com base em características histológicas, camada germinativa de origem e estado de diferenciação.....	11
Tabela 4 - Soluções e respetivos volumes requeridos para a preparação do tampão de lise.	38
Tabela 5 - Descrição dos reagentes utilizados, bem como os seus volumes na preparação dos géis de poliacrilamida para eletroforese, nomeadamente o gel concentrador 4% e o gel separador 10%.....	39
Tabela 6 - Padrão de expressão de Brachyury ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37.....	48
Tabela 7 - Padrão de expressão de Hairy1 ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37.....	57
Tabela 8 - Comparação dos padrões de expressão de Brachyury e Hairy1 ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37.....	58
Tabela 9 - Série ordenada de reagentes pelo qual as lâminas foram sujeitas e respetivos períodos no primeiro dia do procedimento experimental.	78
Tabela 10 - Série ordenada de reagentes pelo qual as lâminas foram sujeitas e respetivos períodos no último dia do procedimento experimental.....	78

Índice de Figuras

Figura 1 - Migração das células do epiblasto de um embrião durante a gastrulação aquando da formação dos três folhetos germinativos.	2
Figura 2 - “Hallmarks” do Cancro.	5
Figura 3 - Relação inversa entre os processos de proliferação e de diferenciação ao longo do tempo em células estaminais embrionárias e em células estaminais cancerígenas.	8
Figura 4 - Processo da carcinogénese.	14
Figura 5 - Árvore filogenética da família de genes T-box de vertebrados mostrando a relação dos genes nas cinco subfamílias indicadas à esquerda.	23
Figura 6 - Representação esquemática dos domínios funcionais de Brachyury (T).....	25
Figura 7 - Expressão cíclica do mRNA de c-hairy1 na mesoderme pré-somítica durante a somitogénese.	30
Figura 8 - Esquema representativo dos diferentes gradientes moleculares de FGF, Wnt e ácido retinóico (RA) na mesoderme pré-somítica (PSM) no embrião de galinha.....	31
Figura 9 - Estrutura e domínios conservados das proteínas Hes.	31
Figura 10 - Esquema representativo da distribuição dos cortes histológicos de cada amostra biológica são distribuídos ao longo de cada duas lâminas.	35
Figura 11 - Otimização da deteção da expressão de Brachyury (T) por imunohistoquímica em embriões de galinha.....	42
Figura 12 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH11 a HH15.	43
Figura 13 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH17 a HH21.	44
Figura 14 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH23 a HH29.	45
Figura 15 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH35 a HH37.	46
Figura 16 - Otimização da deteção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha.	49
Figura 17 - Otimização da deteção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha.	50
Figura 18 - Otimização da deteção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha.	51

Figura 19 - Otimização da detecção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha.	52
Figura 20 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH11 a HH19.	53
Figura 21 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH17 a HH23.	54
Figura 22 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH25 a HH29.	55
Figura 23 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH31 a HH37.	56
Figura 24 - Otimização da detecção da proteína de Brachyury (T) por análise de western blot em 10 µg de extrato proteico de embrião de galinha HH14.....	59
Figura 25 - Detecção por western blot de Brachyury em embriões de galinha entre HH25 e HH32.	60
Figura 26 - Otimização da detecção da proteína Hairy 1 (H1) por análise de western blot em embrião de galinha HH14.....	62
Figura 27 - Otimização da detecção da proteína Hairy 1 (H1) por análise de western blot em embrião de galinha HH14.....	62
Figura 28 - Detecção por western blot de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha HH25-32..	64
Figura 29 - Otimização da detecção da expressão de Brachyury (T) por imunofluorescência em embrião de galinha HH22.....	79
Figura 30 - Otimização da detecção da expressão de Hairy (H1) por imunofluorescência em embrião de galinha HH22.....	79
Figura 31 - Detecção da sonda de T em gel de eletroforese.	80
Figura 32 - Otimização da detecção da expressão do mRNA de Brachyury (T) por hibridação in situ em embriões de galinha HH11, 12 e 13, revelados ao longo de 5 dias.	81

Abreviaturas

- ABCB1 – *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1*
- ABL – *Abelson tyrosine-protein kinase 1* (Proteína Tirosina Quinase Abelson 1)
- APC – *Adenomatous polyposis coli*
- APCs – *Antigen-presenting cells* (Células Apresentadoras de Antígenos)
- Bcl2 – B-cell Lymphoma 2
- CCDN1 – Ciclina D1
- CCNA1 – Ciclina A1
- CCND1 – B-cell leukemia/lymphoma 1
- CCND3 – Ciclina D3
- CD133/24/44 – *Cluster of Differentiation 133/24/44*
- CDC2 – CDK1
- CDC6 – *Cell Division Cycle 6*
- CDK2 – *Cyclin-dependent Kinase 2*
- CDK4/6 – *Cyclin-dependent Kinase 4/6*
- CEC – Células Embrionárias Cancerígenas
- CEE – Células Embrionárias Estaminais
- Ch-T – Homólogo de Brachyury em galinha
- CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*
- DAB – 3,3'-Diaminobenzidina
- DCLK1 – *Doublecortin Like Kinase 1*
- DHFR – *Dihydrofolate reductase*
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- E2F1-3 – *E2 Transcription Factor 1-3* (Fatores de Transcrição 1-3 da família E2)
- EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor* (Recetor do fator de crescimento epidérmico)
- EOMES – Eomesodermin
- FGF – *Fibroblast Growth Factor* (Fator de crescimento de fibroblastos)
- GAP – *Glyceraldehyde 3-phosphate* (Gliceraldeído 3-fosfato)
- GDP – *Guanosine Diphosphate* (Guanosina Difosfato)
- GLI1 – *Glioma-Associated Oncogene 1* (Oncogene Associado A Glioma 1)
- H1 – Hairy1
- Hes - *Hairy and Enhancer of Split-1*

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre Cancro)

IDH – Enzima Isocitrato Desidrogenase

IHC – Imunohistoquímica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

MCM2-7 - *Minichromosome Maintenance Proteins 2-7* (Complexo Proteico De Manutenção de Minicromossoma 2-7)

mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

MVA-brachyury-TRICOM – *Modified Vaccinia Ankara – Brachyury – Triad of T-Cell Co-Stimulatory Molecules*

MYB – Família de Fatores de Transcrição Myb

MYBL2 – *MYB Proto-Oncogene Like 2*

Myc – Família de Fatores de Transcrição Myc

NMPs – *Neuro-Mesodermal Progenitors* (Progenitores Neuromesodérmicos)

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53/TP53 – *Tumor Protein with 53 kDa* (Proteína de Tumor com 53 kDa)

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação Em Cadeia Da Polimerase)

PCR-RT – *Real Time Polymerase Chain Reaction* (Cadeia de Polimerase em Tempo Real)

PDGFB – *Platelet Derived Growth Factor Subunit B* (Subunidade B do Fator de Crescimento derivado de Plaquetas)

PIK3/AKT – *Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B*

PIK3CA – *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*

PLK – *Polo-like kinases* (Quinase Polo-like)

PSA – Persulfato de Amônio

PSM – *Presomitic Mesoderm* (Mesoderme Pré-Somítica)

RA – *Retinoic Acid* (Ácido Retinóico)

Rb - Proteína de Retinoblastoma

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato de Sódio)

Shh – Sonic Hedgehog

T – Brachyury

TBST – *Tris-buffered Saline with 0.1% Tween* (Solução Salina Tamponada com Tris e Tween)

TEM – Transição Epitélio-Mesenquimal

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TGF β – *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Transformação do Crescimento Beta)

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

Xbra – homólogo de Brachyury em *Xenopus*

YAP – *Yes Associated Protein* (Proteína Associada a Yes)

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo.....	ix
Abstract	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Figuras.....	xiv
Abreviaturas	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Desenvolvimento embrionário	1
1.1.1. Cancro – uma doença do desenvolvimento embrionário	4
1.2. Carcinogénese.....	8
1.3. Brachyury na carcinogénese.....	14
1.3.1. Brachyury em tumores derivados das diferentes linhagens germinativas	17
1.3.2. Brachyury em gliomas	19
1.4. Brachyury no desenvolvimento embrionário	22
1.4.1. Brachyury na Gastrulação	25
1.4.2. Brachyury na diferenciação da mesoderme	26
1.4.3. Interatores moleculares de T específicos de mesoderme e de endoderme.....	27
1.5. Hairy1 – Um novo interator proteico de Brachyury	29
1.6. Objetivos	33
2. Procedimentos Experimentais	34
2.1. Imunohistoquímica	34
2.1.1. Recolha das amostras biológicas	34
2.1.2. Deteção da localização proteica por imunohistoquímica.....	34
2.2. Análise proteica por <i>Western blot</i>	36
2.2.1. Recolha das amostras biológicas	37

2.2.2. Extração e quantificação proteína.....	37
2.2.3. SDS-PAGE.....	38
3. Resultados e Discussão	41
3.1. Caracterização da expressão de T ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso no embrião de galinha	41
3.2. Caracterização da expressão de H1 nos tecidos de embrião de galinha ao longo do desenvolvimento	48
3.2.1. Otimização da detecção de Hairy1 por imunohistoquímica	48
3.2.2. Expressão de Hairy1 ao longo do desenvolvimento do tecido neural	52
3.3. Detecção e quantificação da proteína T nos estádios HH25, 29, 30 e 32.....	59
3.4. Detecção e quantificação da proteína H1 em embriões de galinha de estadio HH25, 29, 30 e 32	61
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	66
5. Referências Bibliográficas	68
6. Anexos.....	78
6.1. Protocolos de tratamento das lâminas para detecção proteica por Imunohistoquímica	78
6.2. Otimização de dupla-imunofluorescência para comparação da localização de T e de H1 em embriões de galinha ao longo do desenvolvimento.....	79
6.3. Detecção da localização do mRNA de T em embriões de galinha por hibridação <i>in situ</i>	80
6.3.1. Preparação de plasmídeo linearizado para posterior produção de sonda T	80
6.1.1. Hibridação <i>in situ</i>	80

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento embrionário

Desde cedo, o estudo da Embriologia levantou questões científicas pertinentes sobre como se formavam os órgãos ou como era possível existir diferenças morfológicas entre os membros inferiores e os membros superiores num único organismo. Essas perguntas fizeram com que muitas outras áreas científicas fossem exploradas estabelecendo ciências biológicas independentes como a genética, a biologia celular, a neurobiologia e a oncologia, entre outras. Ao longo das décadas seguintes, o campo de estudo destas “disciplinas-filhas” começou a crescer, ganhando destaque e assumindo a sua própria identidade (1). Paralelamente, a área da Biologia do Desenvolvimento estabeleceu-se enquanto área de investigação multidisciplinar, que procura compreender os múltiplos processos moleculares, celulares, químicos, físicos, entre outros, que convergem para a formação de um organismo vivo (1).

O desenvolvimento embrionário inclui um vasto conjunto de processos que são determinantes para a formação de um organismo completo e autónomo, os quais são estudados no âmbito de uma área científica denominada Biologia do Desenvolvimento. A Biologia do Desenvolvimento ocupa-se do estudo dos processos embrionários e de desenvolvimento, os quais incluem o estudo das vias de sinalização que se ativam ou desativam nas células de um embrião, desde que se dá a fecundação até que se forma um organismo completo (2). Além do desenvolvimento embrionário, a Biologia do Desenvolvimento também se ocupa do estudo da maturação e renovação de alguns órgãos após o nascimento de um ser, como é o caso da pele do humano que se renova diariamente substituindo as células mais velhas por células mais novas e o exemplo da medula óssea que assegura o desenvolvimento constante de milhões de novos glóbulos vermelhos. Para além destes, a Biologia do Desenvolvimento também estuda a capacidade de regeneração que alguns animais possuem para desenvolver partes do seu organismo que foram cortadas e ainda a capacidade que alguns animais têm em transformar o seu organismo através do processo de metamorfose (3). Em suma, os investigadores da Biologia do Desenvolvimento deparam-se com questões científicas que se agrupam dentro das seguintes categorias: diferenciação, morfogénese, crescimento, reprodução, regeneração, integração ambiental e evolução (3).

Durante o desenvolvimento embrionário e à medida que as células do embrião sofrem repetidos ciclos de divisão, as células começam a assumir destinos celulares

distintos, diferenciando-se e formando diferentes estruturas para desempenhar diferentes funções (2). Um dos eventos mais importantes para o desenvolvimento de um embrião decorre durante a gastrulação, quando se dá a formação dos três folhetos embrionários – endoderme, mesoderme e ectoderme – cuja aparência é a de três camadas que se desenvolvem coordenadamente no espaço e ao longo do tempo. Nos estádios que precedem a gastrulação, o embrião é constituído por duas camadas de células: o epiblasto e o hipoblasto. A formação da endoderme, da mesoderme e da ectoderme dá-se através de movimentos coordenados das células que migram pela linha primitiva na camada do epiblasto em direção ao blastocélio (Figura 1) (4). A camada do hipoblasto contribui para a formação dos tecidos extraembrionários e é essencial para a sinalização molecular que regula a migração das células do epiblasto sob a influência de sinais produzidos pela ativação de vias de sinalização como é o caso de Wnt, Sonic Hedgehog (Shh), Notch, Fgf, TGF β , entre outras, através de um processo fundamental denominado de transição epitélio mesenquimal (TEM) (5). O conhecimento das origens embrionárias dos tecidos adultos é fundamental para uma correta compreensão das patologias que lhes estão associadas.

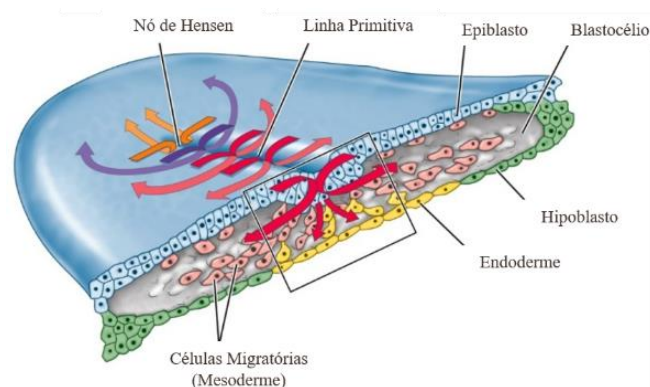


Figura 1 - Migração das células do epiblasto de um embrião durante a gastrulação quando da formação dos três folhetos germinativos. A gastrulação envolve a ação de múltiplas vias de sinalização que contribuem para a proliferação das células bem como os seus movimentos coordenados através da linha primitiva (adaptado de Gilbert (6)).

Durante a gastrulação, o corpo do embrião estende-se ao longo do eixo ântero-posterior enquanto cada folheto embrionário dá origem a diferentes células precursoras de tecidos e órgãos por interação com os restantes folhetos no vertebrado (3). A ectoderme origina os precursores celulares do cérebro, da medula espinal, dos neurónios motores, da retina, do sistema nervoso periférico (células de Schwann, células da glia, sistema nervoso

simpático, sistema nervoso parassimpático), da medula adrenal, dos melanócitos, da cartilagem facial, da dentina dos dentes, da epiderme, do cabelo, das unhas, das glândulas sebáceas, do epitélio do olfato, do epitélio da cavidade oral, do esmalte dos dentes, da hipófise anterior, da córnea e do cristalino ocular. A mesoderme origina as células precursoras dos rins e das gônadas, da cabeça, do esqueleto e musculatura axiais e dos sómitos, do sistema circulatório, das cavidades do corpo, da pélvis, dos ossos dos membros superiores e inferiores e dos tecidos extraembrionários. A endoderme dá origem às células precursoras dos tecidos dos órgãos dos sistemas digestivo e respiratório, nomeadamente dos pulmões, o pâncreas, o fígado, a vesícula biliar e os intestinos (Tabela 1) (3).

Tabela 1 - Tecidos e órgãos que derivam a partir dos três folhetos germinativos durante o desenvolvimento embrionário (adaptado de Gilbert (4)).

Endoderme			
Sistema digestivo			Sistema Respiratório
Região Posterior	Região Média	Região Anterior	
Células precursoras do intestinos	Células precursoras do pâncreas, vesícula biliar e fígado	Precusores do pulmão e da glândula tireóide	
Mesoderme			
Mesoderme intermédia	Mesoderme paraxial	Mesoderme Lateral	Notocorda
Rins Gónadas	Cabeça Sómitos	Esplâncnico (sistema circulatório) Somático (cavidade do corpo, pélvis, ossos dos membros) Extraembrionico	Discos intervertebrais (núcleo pulposos)
	Esclerótomo (cartilagem) Sindetoma (tendões) Miótomo (musculoesquelético) Células endoteliais (aorta dorsal) Dermátomo (derme, musculoesquelético)		
Ectoderme			
Tubo neural	Crista Neural	Superfície ectodérmica (epiderme)	
Cérebro Espinal medula Neurónios motores Retina ocular	Sistema Nervoso Periférico (células Schwann, células da glia, sistema nervoso simpático, sistema nervoso parassimpático) Medula adrenal Melanócitos Cartilagem facial Dentina dos dentes	Epiderme Cabelo Unhas Glândulas sebáceas Epitélio do olfato Epitélio da cavidade oral Esmalte dos dentes Hipófise anterior Córnea e Cristalino	

1.1.1. Cancro – uma doença do desenvolvimento embrionário

Inicialmente, terão sido investigadores embriologistas a afirmar que a patologia também era uma área que devia ser compreendida através da Biologia do Desenvolvimento e, por consequência, foram os primeiros a estudar os tumores como o produto de anomalias ocorridas nos mecanismos celulares e moleculares essenciais para o desenvolvimento dos organismos (1). Atualmente, a literatura disponibiliza estudos científicos que demonstram que as células cancerígenas podem, não só recapitular algumas vias de sinalização fundamentais para o desenvolvimento em prol da progressão tumoral, como reproduzir características que as células embrionárias têm para aumentar a sua mobilidade e invasão (2).

Para compreender o cancro, é necessário compreender o seu funcionamento e os mecanismos ativos que o sustentam. Em 2011, Hanahan e Weinberg propuseram um conjunto de dez características (*hallmarks*) que os tumores assumem ao longo da tumorigénese, desde que se forma uma célula cancerígena até à sua metastização, isto é, até que se formam tumores secundários noutras partes do organismo (6). Estas características compreendem (A) a sustentação de vias de sinalização de proliferação, resultado da ativação/sobre-expressão de genes promotores da tumorigénese (proto-oncogenes); (B) a evasão aos supressores de crescimento, resultado de mutações que inativam os genes que regulam negativamente a proliferação celular, isto é, o ciclo celular (genes supressores tumorais); (C) a resistência à morte celular, como consequência de mutações em genes relacionados com processos como a apoptose, por exemplo; (D) a replicação celular infinita e (E) a instabilidade e mutações do genoma, resultado de quando há inativação de genes como TP53 e Rb, por exemplo; (F) a indução de mecanismos de angiogénese por mutações em fatores que promovem a formação de novos vasos sanguíneos, como VEGF e FGF1/2; (G) a ativação da invasão e metástases pelo facto de ocorrerem mutações em genes promotores da transição epitélio-mesenquimal, por exemplo; (H) a inflamação promovida pelo tumor, (I) a reprogramação do metabolismo celular e (J) a evasão à destruição pelo sistema imunitário (Figura 2) (6).



Figura 2 - “Hallmarks” do Câncer. Características adquiridas pelas células cancerígenas que promovem a progressão e o crescimento descontrolado de um tumor (Adaptado de (8)).

Existem múltiplas evidências de paralelismos existentes entre os processos de desenvolvimento embrionário e de tumorigênese, dos quais alguns serão de seguida mencionados:

- Tal como foi referido anteriormente, existem vias de sinalização que estão ativas durante o desenvolvimento embrionário, como é o exemplo das vias de Wnt e Hedgehog (HH), que participam em processos como a proliferação celular, a determinação do destino de cada célula, a migração, a padronização dos eixos embrionários e a formação dos membros (2). Porém, a hiper-ativação de algumas vias básicas da embriogénese num tecido adulto, contribui para a sustentação das vias de sinalização de proliferação durante a tumorigénese (2). Para manter as vias de sinalização proliferativas constantemente ativas, as células tumorais sobre-expressam oncogenes e/ou inativam genes supressores tumorais, como na via de sinalização Wnt em que a perda do gene supressor tumoral APC a torna hiperativa por estabilizar as proteínas alvo de Wnt (7).

- Geralmente, os tumores têm um tecido denominado de estroma, o qual contribui para que a manutenção do tecido tumoral seja preservada (2). Segundo

Hanahan e Weinberg (6), o estroma é composto por leucócitos, fibroblastos, vasos linfáticos, entre outros, de modo a criar um microambiente favorável à progressão do tumor. Desta forma, é possível observar a capacidade que alguns tumores têm para induzir mecanismos captando os nutrientes necessários para a sobrevivência das suas células da mesma forma que um embrião capta os nutrientes de que necessita através de trocas de sinais entre as células do epitélio e do mesênquima da placenta para a formação de múltiplos órgãos, durante o desenvolvimento (6).

- Tal como já foi mencionado anteriormente, ocorrem mudanças morfológicas e movimentos celulares que envolvem transições epitélio-mesenquimais (TEM) aquando da embriogénese. As células embrionárias passam por uma TEM para formar a endoderme e a mesoderme durante a gastrulação. Para isso, as células do epiblasto perdem a polaridade apico-basal e a adesão às células vizinhas e ganham uma maior capacidade de motilidade, resultando na perda do seu fenótipo epitelial para assumir um fenótipo e mobilidade característicos de células mesenquimais (2). No entanto, não são só as células embrionárias que passam por este processo. As células tumorais também repetem o processo TEM dissolvendo as junções intercelulares, perdendo a polaridade apico-basal, reorganizando a arquitetura do seu citoesqueleto, adquirindo a capacidade para degradar proteínas da matriz extracelular de modo a aumentar a mobilidade e ativar a invasão e a metástase noutras partes do organismo (8). Estes eventos ocorrem como consequência da diminuição da expressão de genes que codificam para proteínas para um fenótipo epitelial e da sobre-expressão de genes codificantes para um fenótipo mesenquimal (8).

- Existem tumores que apresentam diversidade histopatológica, tendo regiões com diferentes graus de diferenciação, proliferação, vascularização, inflamação e/ou metastização, dando origem a subpopulações de células cancerígenas geneticamente diferentes dentro do mesmo tumor (9). Vários estudos demonstraram que alguns tipos de tumor apresentam uma subpopulação de células pouco diferenciadas e que expressam marcadores característicos de células estaminais normais como CD133, CD24, CD44, DCLK1, CXCR4, Oct4 e ABCB1 em cancros pancreáticos e CD44+/CD24- em cancros de mama (10)(11). Esta subpopulação detetada nas massas tumorais foi intitulada de células estaminais cancerígenas (CEC) pelo facto de, não só apresentar características semelhantes às células estaminais embrionárias (CEE), como também por terem

a capacidade para se diferenciar noutros tipos celulares, e voltar a desdiferenciar-se (12)(13). O conceito de células estaminais cancerígenas surgiu há algumas décadas afirmando que um tumor cresce graças à presença de células pouco diferenciadas e que garantem a manutenção e a renovação das células tumorais (14). Atualmente, a existência deste conjunto de células tem recebido cada vez mais atenção por parte dos investigadores da área do cancro existindo já referências acerca da contribuição das células estaminais cancerígenas para a autorrenovação de linhagens de células tumorais tendo implicações na resistência às terapias anti-tumorais e na formação de metástases (15)(16).

- Para além destas evidências, também foi observada a formação de tumores a partir de células embrionárias que permaneceram nos tecidos adultos mesmo após o desenvolvimento embrionário ter terminado – teratomas e teratocarcinomas (6). A deteção destes tumores apoia a noção de que o cancro é uma doença do desenvolvimento, uma vez que são tumores que derivam de células estaminais ou de células progenitoras normais, as quais perderam a capacidade de autorregular a sua proliferação e a sua quiescência (12).

Ao longo do desenvolvimento, o ser vivo encontra-se numa fase na qual as CEE apresentam uma elevada taxa de proliferação que diminui ao longo do tempo à medida que os tecidos e os órgãos se formam. Durante essa fase, as CEE sofrem cada vez mais processos de diferenciação celular à medida que o embrião se desenvolve e que cada célula adquire um destino celular diferente. Por outro lado, vários estudos evidenciam que durante a tumorigénese, as células cancerígenas exibem uma elevada capacidade de diferenciação no início da formação de um tumor o que lhe confere uma elevada heterogeneidade celular resultando na resistência às terapias anti-tumorais (13). Contrariamente às CEE, as células cancerígenas não completam o processo de diferenciação e vários estudos demonstraram a presença de células pouco diferenciadas em tumores avançados podendo explicar o aparecimento de metástases ou reincidências tumorais após a erradicação da doença em certos pacientes (13). Além da presença de células tumorais pouco diferenciadas, também se verifica o aumento da capacidade proliferativa destas células tumorais em fases avançadas da tumorigénese (16). Assim, é possível estabelecer uma relação inversa entre os processos de proliferação e de diferenciação das células estaminais embrionárias e das células estaminais cancerígenas em tecidos embrionários e em tecidos tumorais (Figura 3).

O cancro pode ser visto como uma doença do normal desenvolvimento embrionário, uma vez que resulta do distúrbio de alguns processos e vias de sinalização fundamentais para o desenvolvimento de um embrião saudável (6). Assim, a Biologia do Desenvolvimento é uma área de estudo que deve ser levada em consideração para o desenvolvimento de novas terapias e para a descoberta de novos biomarcadores de modo a melhorar as estratégias terapêuticas e de diagnóstico já existentes e contrariar a resistência dos tumores às terapias existentes, evitando a sua reincidência (1).

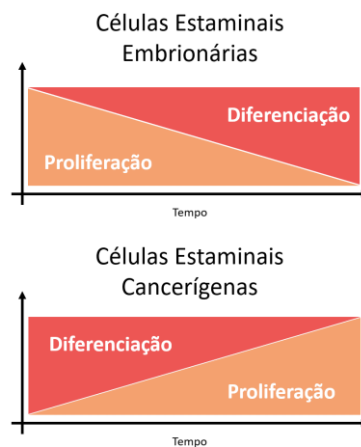


Figura 3 – Relação inversa entre os processos de proliferação e de diferenciação ao longo do tempo em células estaminais embrionárias e em células estaminais cancerígenas.

1.2. Carcinogénese

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo e, segundo os resultados de um estudo orientado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), prevê-se que a sua incidência e mortalidade aumentem nas próximas décadas (Tabela 2) (IARC, OMS: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/>) (92). Em 2012, foram registados cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por cancro em todo o mundo (19). Seis anos mais tarde, em 2018, registaram-se cerca de 18,1 de novos casos e 9,6 milhões de mortes e em 2040 prevêem-se 29,5 milhões de novos casos e 16,4 milhões de óbitos causados por esta doença a nível global (IARC, OMS: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/>). Estes dados estatísticos comprovam a urgência com que devem ser desenvolvidas novas abordagens terapêuticas anti-tumorais.

Tabela 2 – Incidência e mortalidade causadas por cancro previstas a nível global. Estes cálculos foram obtidos pelo projeto GLOBOCAN 2018 pela OMS (IARC, OMS: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/data>) (92).

	Incidência	Mortalidade
2018	18 078 957	9 555 027
2020	19 292 789	9 958 133
2025	21 618 445	11 367 651
2030	24 044 406	12 903 603
2035	26 514 522	14 543 112
2040	28 887 940	16 180 202

O cancro pode ser visto como um conjunto de doenças que resulta da transformação inicial de uma célula normal numa célula cancerígena, da sua proliferação descontrolada e da formação de um ou vários tumores que se não forem erradicados poderão levar à falência dos órgãos saudáveis e à morte do hospedeiro (20). Para melhor compreender, diagnosticar e tratar este conjunto de patologias, surgiu a necessidade de agrupar os diferentes tipos de tumores e criar regras de nomenclatura. Apesar de existirem muitas formas de classificá-los, atualmente a categorização mais utilizada distingue-os ordenadamente consoante o seu estado de diferenciação, a sua origem embrionária e o seu comportamento biológico (20). De acordo com a estrutura, a matriz extracelular e as funções das células normais, um tecido pode ser epitelial, conjuntivo, muscular ou nervoso (21). Uma vez que os tumores surgem a partir de múltiplos tipos celulares do organismo, estes podem ser classificados como tumores de três tipos: epiteliais, não epiteliais ou mistos. Um exemplo de tumores epiteliais são os carcinomas, enquanto os sarcomas são tumores de origem mesenquimal (não epitelial). Dentro de cada uma das categorias acima descritas, os tumores são depois divididos consoante a origem embrionária do tecido a partir do qual se formam, isto é, podem ser de origem ectodérmica, mesodérmica ou endodérmica (20). Por exemplo, um carcinoma do tecido mamário e um carcinoma do tecido pulmonar são ambos tumores epiteliais, contudo, têm origens embrionárias diferentes. Por outro lado, um carcinoma do tecido renal e um sarcoma do tecido ósseo formam-se ambos a partir do mesmo folheto embrionário – a

mesoderme – no entanto, não fazem parte do mesmo grupo de tumores pois têm estados de diferenciação diferentes. Por fim, dentro de cada um dos diferentes grupos até aqui mencionados, os tumores são distinguidos segundo o seu comportamento biológico durante a sua proliferação, ou seja, podem ser classificados como benignos quando as suas células crescem compactamente como um nódulo e se cingem ao local de origem ou podem ser classificados como malignos se as suas células perderem adesão às suas células adjacentes e forem transportadas para outros tecidos iniciando novos tumores, um processo que é denominado por metastização (20). Um exemplo disso é o adenocarcinoma na mama que se desenvolve a partir de um tecido epitelial, tem origem embrionária endodérmica e é maligno, mas caso não apresentasse metastização seria benigno e seria denominado de adenoma (Tabela 3). Existem ainda tumores que não se encaixam especificamente numa categoria, como é o caso dos teratomas e dos teratocarcinomas que são tumores que parecem ter derivado de células precursoras sexuais e que se diferenciaram ectopicamente durante o desenvolvimento fetal. Uma vez que têm a capacidade de manter o seu estado de pluripotência, também podem formar tumores com características próprias de qualquer folheto embrionário (20).

Tabela 3 - Classificação dos diferentes tipo de câncros com base em características histológicas, camada germinativa de origem e estado de diferenciação. Esta taxonomia tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico e para o tratamento clínico da maioria dos tumores uma vez que responde a três determinantes críticos da biologia tumoral: o tecido embrionário de origem e a célula normal de origem do tumor, o fenótipo da célula que sofreu transformação (por exemplo, de epitelial para mesenquimal), e a extensão da progressão para um estado maligno (adaptado de 22).

Estado de Diferenciação - Epitelial			Estado de Diferenciação - Não Epitelial		
Derivação Embrionária Ectoderme Tipo celular Mama Glândulas sudoríparas Glândulas salivares Benigno Adenoma Maligno Adenocarcinoma Tipo celular Pele Queratinócitos Benigno Papiloma Maligno Carcinoma das células de escamosas	Derivação Embrionária Endoderme Tipo celular Tiróide Pulmão Estômago Fígado Pâncreas Intestino delgado Cólon Próstata Benigno Adenoma Maligno Adenocarcinoma	Derivação Embrionária Mesoderme Tipo celular Rim Testículos Endométrio Benigno Adenoma Maligno Adenocarcinoma Hiararquia de classificação de tumores I – Estado de Diferenciação 1 – Epitelial 2 – Não Epitelial 3 – Misto II – Origem Embrionária 1 – Ectoderme 2 – Endoderme 3 – Mesoderme III – Comportamento Biológico 1 – Benigno 2 – Maligno	Derivação Embrionária Mesoderme Mesenquimal Benigno Fibroma Lipoma Osteoma Cartilagem Músculo liso Células endoteliais Maligno Fibrossarcoma Lipossarcoma Osteossarcoma Condrossarcoma Leiomioma Hemangioma Hematopoiético Tipo celular Linfócitos Leucócitos Nome do Tumor Linfoma Leucemia	Derivação Embrionária Neuroectoderme Sistema Nervoso Tipo celular Astrócitos Retina Oligodendrócitos Células de Schwann Nome do Tumor Astrocitoma Retinoblastoma Oligodendroglioma Schwannoma Outro Tipo celular Melanócito Nome do Tumor Melanoma	
Estado de Diferenciação - Misto Tipo celular Células germinativas Benigno Quisto dermóide Maligno Carcinoma embrionário Teratoma			Estado de Diferenciação - Misto Tipo celular Células somáticas Benigno Hamartoma Adenoma Tumor misto das glândulas salivares Maligno Tumor de Wilms Carcinoma mucocutâneo Carcinoma Epitelio-miocitoma		

A formação de um tumor é um processo complexo e progressivo o que significa que passa por diferentes fases desde o momento em que uma célula normal sofre alterações no seu genoma e/ou no seu epigenoma até que metastiza em locais diferentes do ponto de origem do tumor primário (22). A primeira fase da formação de um tumor – iniciação – é assinalada por sucessivas alterações genéticas e epigenéticas nas células normais somáticas ou germinativas, as quais podem ocorrer em múltiplos genes (23). Alguns exemplos de genes que sofrem alterações genéticas que levam à formação de um tumor são que codificam para fatores de crescimento (FGF4, PDGFB), recetores de fatores de crescimento (EGFR), proteínas transdutoras de sinal (ABL, Ras, PIK3CA), fatores de transcrição (GLI1, p53, Myc, Brachyury), reguladores do ciclo celular (CCND1, Rb) e/ou inibidores da apoptose (Bcl2) (24).

Geralmente, as mutações observadas nas células cancerígenas são em genes que regulam os processos responsáveis pelo crescimento celular e dividem-se em dois grupos: (A) genes cuja função é promover a proliferação celular e (B) genes em que o seu propósito é controlar ou suspender por completo, se necessário, o ciclo celular. Estas duas classes de genes denominam-se proto-oncogenes e genes supressores de tumores, respetivamente. No contexto tumorigénico, quando um destes genes sofre uma mutação, pode ocorrer uma alteração ao nível da estrutura da proteína que por ele é codificado levando a que a sua função seja ativada/exacerbada ou eliminada/atenuada, respetivamente (25). Se a mutação ocorrer em regiões reguladoras do genoma, pode ainda haver alteração dos seus níveis de expressão.

Um exemplo de um proto-oncogene é o Ras que codifica para um membro do grupo das proteínas GTPases que, após a ativação de recetores tirosina quinase, é recrutado para a membrana citoplasmática e ao se ligar a uma molécula de guanosina difosfato (GDP) promove o ganho de um grupo fosfato passando, posteriormente, a estar ligado a uma molécula de guanosina trifosfato (GTP). Esta ligação ativa vários outros efetores que por sua vez transmitem uma série de sinais através de vias de sinalização de proliferação celular. Quando as proteínas ativadoras de Ras-GTPase (GAPs) aceleram a atividade de Ras, fazem com que este permaneça ligado a GDP fazendo com que este perca um grupo fosfato levando à suspensão da função de Ras. Num contexto tumorigénico, Ras não é capaz de se desligar de GTP ocorrendo um desequilíbrio entre a quantidade de complexos existentes de GTP-Ras e de GDP-Ras, fazendo com os seus efetores ativem constitutivamente vias de sinalização de proliferação promovendo o desenvolvimento de tumores (26).

Contrariamente aos proto-oncogenes, existe um conjunto de genes que ao serem mutados, sofrem uma diminuição da sua expressão e/ou atividade. Tem-se verificado que no tecido tumoral a inativação de genes supressores tumorais resulta no descontrolo dos processos proliferativos das células cancerígenas (27). Geralmente, as classes de genes supressores tumorais mais afetadas são fatores de transcrição que regulam *checkpoints* do ciclo celular (ex., p53), repressores do ciclo celular (ex., Rb) e reguladores de proteínas proto-oncogénicas (ex., APC) (25). Rb pertence a uma família de proteínas que contém um domínio de ligação capaz de interagir com um vasto conjunto de outras proteínas como é o caso da família E2F. Em células normais, Rb tem um efeito anti-proliferativo. Quando é fosforilado pelos complexos Ciclina D/CDK4 e Ciclina D/CDK6 torna-se inativo, sendo incapaz de se ligar a E2F que fica livre para ativar os seus genes alvo, necessários para a progressão do ciclo celular. A ocorrência de mutações em qualquer um dos intervenientes da via de sinalização de Rb pode fazer com que E2F ative livremente o ciclo celular em qualquer uma das suas fases, ao ativar os seus alvos transcricionais, como CCDN1, CCND3, MYC, CDK2, E2F1-3, MYB, MYBL2, CDC6, DHFR, MCM2-7, PCNA, CCNA1, CDC2 e PLK (27).

Tal como foi mencionado anteriormente, a formação de um tumor é um processo que atravessa diferentes fases desde o momento em que uma célula normal se transforma numa célula cancerígena até que se forma um tumor e, eventualmente, progride para a formação de metástases (22). Após a iniciação do tumor, dá-se a sua progressão que se caracteriza por uma cascata de eventos que ocorrem como é o caso da formação de novos vasos sanguíneos (vascularização) para garantir a disponibilidade de nutrientes, a aquisição da capacidade de escapar as fronteiras impostas pelas células vizinhas (perda de adesão), entrar na corrente sanguínea ou linfática tornando-se numa célula circundante (intravasão), invadir outros tecidos (extravasão) e metastizar em sítios distintos do local do tumor primário (Figura 4) (28).

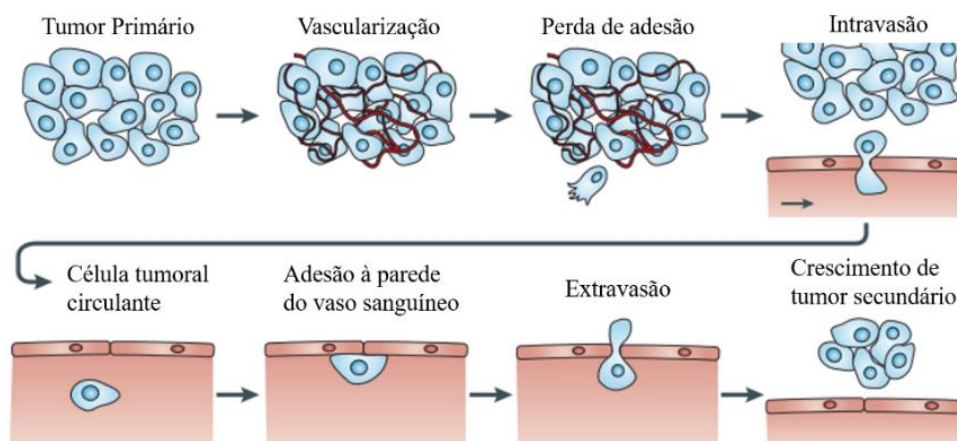


Figura 4 - Processo da carcinogênese. No início do processo da carcinogênese, as células de um tumor vascularizado primário deixam de ter acesso aos nutrientes necessários à sua proliferação e perdem adesão ao seu tecido de origem visando o alcance de novos vasos sanguíneos. Algumas dessas células ao entrar nos vasos sanguíneos adjacentes, circulam livremente no sistema vascular e aderem às suas paredes, extravasando e migrando para outros tecidos onde podem formar um tumor secundário (adaptado de (28)).

1.3. Brachyury na carcinogênese

Em tecidos normais, Brachyury (T) é expresso nas etapas iniciais da embriogênese, nomeadamente na gastrulação, promovendo a TEM das células do epiblasto, ativando a sua migração, possibilitando a formação da mesoderme posterior e a formação da notocorda no embrião vertebrado (29). Apesar de ser expresso fundamentalmente nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, T também se encontra expresso em tecidos de adulto Humano, tais como os testículos e a tiroide (30,31). Para além das suas funções no desenvolvimento, Brachyury está associado à TEM de células tumorais, à formação de metástases, à promoção de características de células estaminais e à resistência à terapia baseada em fármacos citotóxicos (34,35). Neste contexto, foram observados pela primeira vez níveis elevados de Brachyury num cancro raro que se forma a partir de células de notocorda que não desapareceram após o nascimento do bebé e que se alojam nos ossos da base do crânio e/ou na coluna vertebral, o cordoma (33). Estes resultados foram surpreendentes uma vez que até então nunca se tinha observado qualquer expressão de Brachyury em tecidos de organismo adulto. No entanto, surgiram novas evidências científicas que mostram que elevados ou baixos níveis

de expressão Brachyury estavam associados a outros tipos de cancro, cujos exemplos são apresentados adiante.

Relativamente ao seu padrão de expressão, vários estudos demonstraram através de imunohistoquímica que a localização subcelular da proteína T varia em diferentes tipos de tumor. Por exemplo, em alguns cancros derivados de mesoderme, nomeadamente cordomas e hemangioblastomas, Brachyury encontra-se expresso no núcleo das células tumorais (34,35). Noutros carcinomas, encontra-se expresso nos núcleos e/ou no citoplasma das suas células, como é o caso do cancro do pulmão e da próstata (31,36). No entanto, não se conhece a relevância fisiopatológica destes achados.

Sendo um promotor da transição epitélio-mesenquimal, existem cada vez mais evidências de que Brachyury possa contribuir para a formação de um tumor em tecidos em que T esteja a ser expresso. Tem vindo a ser cada vez mais observado que a formação e o crescimento de um tumor não dependem apenas de um conjunto de mutações genéticas, mas sim de um conjunto de condições que tornam a proliferação celular descontrolada favorável (Figura 2). Um dos “*hallmarks*” que um tumor adquire é a ativação da invasão e da metástase, os quais se devem ao ganho de características favoráveis à sua progressão, o que significa que as células que outrora tinham uma componente epitelial que lhes conferia adesão ao tecido de origem e polaridade perdem-na e passaram a ter a capacidade de se moverem que antes não tinham. Nem todas as células que se desconectam do tecido de origem conseguem ultrapassar as barreiras físicas que encontram, como é o exemplo dos vasos sanguíneos ou linfáticos, mas basta que uma célula cancerígena consiga superar esses obstáculos para chegar a outros órgãos e instalar-se noutros tecidos, fixando-se e criando metástases (6) (38).

A sobre-expressão de Brachyury foi observada não só em tumores primários como também em tumores metastáticos. De facto, a sobre-expressão de T está associada à ocorrência de TEM, permitindo às células tumorais epiteliais a aquisição de características mesenquimais, tais como mobilidade e capacidade de invasão, e resistência à terapêutica anti-tumoral (29). Assim, compreende-se que a prevenção ou a reversão deste processo de transição celular possibilitará a minimização da disseminação de tumores e o desenvolvimento de resistência às terapias. Por isso, estão a ser estudadas várias terapêuticas que visam atacar células tumorais sujeitas à TEM através do desenvolvimento de uma resposta imunológica pelo paciente contra Brachyury. Foram recentemente desenvolvidas várias vacinas com o objetivo de ajudar o sistema

imunológico de pacientes com cancro a reconhecer, atacar e destruir as células tumorais que sobre-expressam a proteína Brachyury (39, 40).

Decorreu recentemente um ensaio clínico de fase I que procurou avaliar em pacientes com carcinomas avançados a segurança e a eficácia de uma vacina recombinante de levedura que codifica para T (39). Neste estudo, diferentes doses da vacina foram administradas em 34 pacientes com vários tipos de cancro, nomeadamente, cancro colorretal, cancro da mama, cancro pancreático, cancro da próstata, cancro do trato urinário e cancro no pulmão. A maioria destes apresentou doença refratária com o tratamento progressivo. Além disso, este ensaio clínico revelou que o tratamento foi bem tolerado, uma vez que não provocou efeitos tóxicos devido à dosagem, tendo apenas provocado efeitos adversos relacionados com reações no local da injeção (39). Dado o sucesso desta primeira fase do ensaio, irá passar para a fase II (NCT02383498).

Para além da vacina acima referida, uma outra está a ser estudada em vários ensaios clínicos, nomeadamente, a vacina MVA-brachyury-TRICOM (40). Um deles está a testar a sua eficácia para o tratamento de 38 pacientes com cancro do pulmão, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do ovário e outros tumores. A MVA-brachyury-TRICOM utiliza um vetor viral que possui o gene que codifica para Brachyury e que, em vez de integrar o DNA do hospedeiro após a sua administração, infeta com eficiência as células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como as células dendríticas. Assim sendo, a carga viral é incorporada nas APCs do paciente, as quais induzirão uma resposta imunitária específica contra as células tumorais que sobre-expressam T destruindo-as (40).

Dentro das várias terapêuticas disponíveis para combater o cancro, as vacinas são uma estratégia terapêutica que se caracteriza pela baixa toxicidade associada. No entanto, mesmo com os resultados promissores que os ensaios clínicos demonstram em relação à imunoterapia anti-tumoral, é necessária a combinação desta com outros tratamentos de forma a minimizar ao máximo a resistência das células tumorais com elevados níveis de expressão de Brachyury às respostas imunológicas (41).

1.3.1. Brachyury em tumores derivados das diferentes linhagens germinativas

Tal como foi mencionado anteriormente, novos achados mostraram que elevados níveis de expressão Brachyury estão associados a certos tipos de cancro. Alguns destes tecidos derivam de mesoderme. Recentemente, um estudo publicado teve como principal objetivo analisar a expressão de Brachyury por imunohistoquímica em 96 tumores de células germinativas testiculares, o seu nível de transcrição através de análise *in silico* e, sobretudo, investigar o seu significado clínico neste tipo de tumor. Quanto à sua marcação por imunohistoquímica, verificou-se que cerca de 89,6% dos tumores apresentavam expressão de Brachyury no citoplasma das células e que 24% apresentavam expressão nuclear. Verificou-se também que a sua expressão nuclear estava associada a baixa sobrevida e a um pior prognóstico. Após a análise dos dados, os investigadores propuseram um papel oncogénico para Brachyury em tumores de células germinativas testiculares e deram relevância à sua localização subcelular enquanto biomarcador de mau prognóstico (32).

Além de Brachyury estar implicado em tumores derivados de mesoderme, como é o caso dos testículos, também os seus níveis de expressão elevados se encontram associados a tumores em tecidos derivados de endoderme (Tabela 3). Por exemplo, a expressão de T foi avaliada através de *polimerase chain reaction* (PCR) e por imunohistoquímica (IHC) em tumores pulmonares, cujos tecidos derivaram de endoderme. Os investigadores verificaram que a proteína foi expressa em 41% dos carcinomas primários pulmonares estudados e que não era expressa em tecidos normais, com exceção do testículo normal e da tiroide (30). Além deste achado, o mesmo estudo propôs a eliminação de células tumorais positivas para T pode ser uma ferramenta de prevenção ou diminuição da disseminação tumoral e da formação de metástases em pacientes com cancro do pulmão (30). Um outro estudo procurou compreender o significado clínico da expressão de Brachyury e qual a sua implicação no processo da transição epitelial-mesenquimal no carcinoma pulmonar primário. Ao investigar um conjunto de mais de 100 tecidos de carcinoma primário pulmonar, observou-se que a expressão de Brachyury constituiu um biomarcador significativo para casos de mau prognóstico (30).

Além de se apresentar associado a mau prognóstico de pacientes com cancro no pulmão, outros estudos demonstraram o mesmo fenómeno em pacientes com cancro da próstata, outro órgão que se desenvolve a partir de endoderme (Tabela 3). Estudos realizados em colaboração com o nosso grupo de investigação mostraram que Brachyury é significativamente sobre-expresso em cancro de próstata e em tumores metastáticos quando comparado com tecidos normais, sejam estes níveis de proteína ou de mRNA. Além disso, observaram que a expressão de T no citoplasma se correlaciona com tumores de elevada agressividade, enquanto que a presença de T no núcleo está correlacionada com a metastização (37). Noutra investigação, foi possível observar que linhagens celulares de cancro da próstata que mostram uma sobre-expressão de T apresentam-se mais resistentes à quimioterapia aplicada (42). Por outro lado, a ausência da expressão de T levava a uma menor resistência à terapia. Em suma, os seus resultados demonstraram que, não só Brachyury é um novo biomarcador de agressividade do cancro da próstata e de mau prognóstico, como também demonstraram que o mesmo contribui para a resistência tumoral à quimioterapia, constituindo um alvo terapêutico favorável para pacientes com cancro da próstata avançado (42).

Além destas evidências, existem dados que demonstram uma associação entre a sobre-expressão de T em tumores gastrointestinais primários a alta agressividade dos mesmos (36). Através da análise por imunohistoquímica de 63 pacientes com cancro gastrointestinal, um tumor em tecido derivado de endoderme, observou-se que Brachyury estava sobre-expresso em 81%. Aquando da análise da localização de Brachyury a nível sub-celular e do seu impacto prognóstico, observou-se que quando T era expresso nos núcleos das células tumorais, existiam metástases e que quando a sua localização era citoplasmática, existia uma baixa sobrevida dos pacientes (36).

No entanto, Brachyury não se encontra sobre-expresso só em tecidos tumorais derivados de mesoderme e de endoderme. Um estudo que analisou a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína T em carcinomas de mama humanos (ectoderme, Tabela 3) e tecidos benignos observou que os seus níveis de expressão em células tumorais foram positivamente associados à sua capacidade de invadir a matriz extracelular, formar metástases *in vitro* e resistir à quimioterapia aplicada (38). Outro estudo mostrou que a expressão de mRNA de Brachyury é predominante em carcinomas mamários e que a sua expressão proteica nos núcleos das células tumorais estava mais associada a tumores metastáticos do que a tumores primários. Apesar disso, o mesmo

estudo demonstrou uma associação entre altos níveis de expressão de T em tumor primário e mau prognóstico da doença. Estes resultados conduziram ao desenvolvimento de duas vacinas contra T em cânceros mamários, as quais se encontram em ensaios clínicos (43).

Alguns estudos observaram que a sobre-expressão de T se encontra associada a uma elevada agressividade de tumores de mama e a um pior prognóstico dos pacientes, tal como descrito acima. Noutros, observou-se que a sobre-expressão de T reprime a transcrição de proteínas expressas por células epiteliais e que a sua sob-expressão está associada à diminuição da expressão de marcadores mesenquimais resultando numa transição epitélio-mesenquimal de células tumorais humanas com rápida formação de metástases. Por exemplo, um estudo recente observaram-se que baixos níveis de mRNA e de proteína de Brachyury encontravam-se associados à elevada agressividade tumoral em gliomas e vice-versa e ainda que baixos níveis de Brachyury estavam associados a um pior prognóstico dos pacientes com glioma, tumor este em tecido derivado de neuroectoderme (44). Estes dados sugerem que Brachyury pode ter também um papel de gene supressor tumoral.

Depois destes achados, surgiram novas evidências científicas que mostram que níveis elevados de Brachyury estão associados a outros tipos de cancro com mau prognóstico, sugerindo que Brachyury possa ter um papel oncogénico em certos tipos de tecidos.

1.3.2. Brachyury em gliomas

Apesar de raros, os gliomas são os tumores primários mais comuns que ocorrem no cérebro (45). Os gliomas apresentam alta mortalidade e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são classificados entre I e IV consoante o seu grau de malignidade, sendo que I é o grau menos agressivo e IV é o mais agressivo (45)(46). Segundo a OMS, os tumores do sistema nervoso central podem ser classificados como astrocitomas (aproximadamente 70% dos tumores cerebrais) ou oligodendrogliomas (10-30%) de acordo com a sua histologia, uma vez que têm origem em astrócitos e oligodendrócitos, respetivamente (46)(47). Os astrocitomas representam a forma mais comum de tumores cerebrais e, geralmente, são refratários ao tratamento e não têm cura

(47). Os glioblastomas, considerados tumores de grau IV pela OMS, representam 60-75% de todos os tumores astrocíticos e ocorrem frequentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais. São caracterizados por uma acentuada proliferação e heterogeneidade celular formando vasos sanguíneos com multicamadas e zonas de necrose. Em suma, o glioblastoma é o tumor cerebral primário maligno mais comum, representando cerca de 50% de todos os gliomas e aproximadamente 16% de todos os tumores cerebrais primários (47). Relativamente à histologia dos glioblastomas, estes podem ser subdivididos de acordo com a proliferação de um conjunto específico de células. Neste caso, estes podem ser glioblastomas de células pequenas, gliossarcoma (com áreas de diferenciação mesenquimal e glial), glioblastomas de células gigantes (caracterizado pela presença de uma grande massa tumoral com células multinucleadas) e glioblastomas com um componente oligodendroglial (46).

Com base na evidência dos últimos anos, vários estudos deram a conhecer os mecanismos moleculares responsáveis pela formação de gliomas e qual a sua importância enquanto biomarcadores clínicos aquando do seu diagnóstico, prognóstico e estudo de previsão da doença. Por exemplo, 70 a 80% dos gliomas difusos de grau II e III e cerca de 12% dos glioblastomas apresentam mutações heterozigóticas na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), a qual participa no ciclo de Krebs (48). Além deste estudo, verificou-se que num grupo de 615 gliomas de grau II ou III, 45% tinham apenas mutações IDH e 10% tinham apenas mutações na transcriptase reversa da telomerase (TERT) (49). Além destes, verificou-se também que, tal como noutros tipos de cancro, a via de sinalização PIK3/AKT, as vias de sinalização responsáveis pelo controlo do ciclo celular e o gene TP53 estavam alterados em gliomas (50)(51)(52)(53).

Relativamente aos glioblastomas, existem poucos biomarcadores indicadores de bom/mau prognóstico, ocorre uma fraca resposta dos pacientes à quimioterapia e a taxa de sobrevivência dos pacientes por mais 5 anos é menos de 5% (53), sendo assim urgente a descoberta de novos biomarcadores para glioblastomas.

Segundo um estudo de 2017, observou-se que apenas 30% dos gliomas apresentavam expressão de Brachyury, que regula a proliferação e a indiferenciação celular em glioblastoma por ativação da expressão da proteína associada a Yes (YAP) (54). Com base nestas evidências, um estudo colaborativo envolvendo o nosso grupo de investigação procurou saber qual o papel de Brachyury em gliomas, tendo-se observado que Brachyury é expresso em tecidos cerebrais normais, mas em gliomas está ausente ou

em quantidades reduzidas (44). Observou-se ainda que os níveis de mRNA de Brachyury que se encontram mais baixos em amostras tumorais do que não-tumorais de glioma, ou seja, estão inversamente associados a uma agressividade tumoral (44). Relativamente ao impacto clínico da expressão de Brachyury na sobrevivência dos pacientes deste estudo, verificou-se que baixos níveis deste fator de transcrição correspondem a um pior prognóstico dos pacientes, ao analisar a sua expressão proteica em 413 gliomas e os seus níveis de mRNA em 1141 gliomas (44). Com isto, estes resultados mostram que a perda de Brachyury é um biomarcador importante de mau prognóstico em glioma e sugere que o seu gene tenha um papel supressor tumoral nesta neoplasia surgindo assim uma nova perspectiva sobre a sua função na tumorigênese. Relativamente ao papel funcional de Brachyury em gliomas, verificou-se que a sua sobre-expressão é necessária para provocar alterações nos níveis de proteínas apoptóticas e na indução de autofagia das células de glioma, resultando na diminuição da viabilidade celular e no aumento da morte celular (44). No entanto, embora a sobre-expressão de Brachyury reduza o crescimento de glioma *in vivo*, o seu efeito pode ser dependente do tecido ou do microambiente para desencadear os processos de autofagia ou apoptose.

Com base na literatura, são necessários mais estudos de maneira a compreender a razão pela qual Brachyury está a ser expresso em tecidos não embrionários, uma vez que em tecidos saudáveis desaparece com a diferenciação de células de mesendoderme. A expressão de T em células tumorais requer mais investigação, uma vez que a sua sobre-expressão está tanto associada a maior agressividade e mau prognóstico de pacientes com tumores de tecidos adultos que derivam das linhagens de endoderme e mesoderme como está associada a menor agressividade e melhor prognóstico de pacientes em tumores de tecidos derivados de ectoderme. Posto isto, verifica-se que em tumores de tecidos adultos que derivam de mesoderme e endoderme, T esteja a ter um papel oncogénico e que em tumores de tecidos adultos neuronais esteja a ter um papel supressor tumoral. Por isso e na tentativa de explicar estes fenómenos, surge a necessidade de descrever o padrão de expressão de Brachyury nos diferentes tecidos derivados das distintas linhagens embrionárias. Assim, talvez seja possível descobrir qual o impacto da origem embrionária dos tecidos no seu comportamento na vida adulta, nomeadamente em contexto tumoral.

1.4. Brachyury no desenvolvimento embrionário

Durante o desenvolvimento embrionário, Brachyury (T) é expresso durante a gastrulação participando na formação e diferenciação da mesoderme e da notocorda. Brachyury integra a família de proteínas T-box (Tbx) que se caracterizam pelo seu domínio altamente conservado de ligação ao DNA e que é denominado por T (55). Sabe-se que a família dos genes Tbx é constituída por um conjunto de fatores de transcrição que desempenham várias funções no desenvolvimento embrionário, participando na regulação da especificação celular durante o estabelecimento das diferentes regiões do corpo de um organismo e em processos relacionados com a organogênese (56). Segundo a literatura, foram identificados mais de vinte genes diferentes detentores do domínio proteico T-box em várias espécies, desde invertebrados, como a *Drosophila* e a *Caenorhabditis elegans*, a vertebrados, tais como o peixe-zebra (*Danio rerio*), *Xenopus*, ratinho (*Mus musculus*), galinha (*Gallus gallus*) e humano (*Homo sapiens sapiens*) (57). A família T-box divide-se em cinco subfamílias filogenéticas (Figura 5): (a) T, que engloba o gene fundador Brachyury (T) e Tbx19/Tpit; (b) Tbx1, incluindo Tbx1, Tbx10, Tbx15, Tbx18, Tbx20 e Tbx22; (c) Tbx2, agrupando os genes Tbx2, Tbx3, Tbx4 e Tbx5; (d) Tbx6, que é composta por Tbx6 e Mga e (e) Tbr1, que reúne Tbr1, Tbr2/EOMES e Tbx21/Tbet. Foram identificados também os genes Drtbx6 e Drtbx16 que fazem parte da subfamília Tbx6, no entanto, apenas se encontram presentes em peixe-zebra, não tendo genes ortólogos em mamíferos. Os diferentes fatores de transcrição Tbx participam em processos no início da embriogénese, na formação do sistema cardíaco (cardiogénese), no desenvolvimento membranar e na formação e maturação de células estaminais/progenitoras (57).

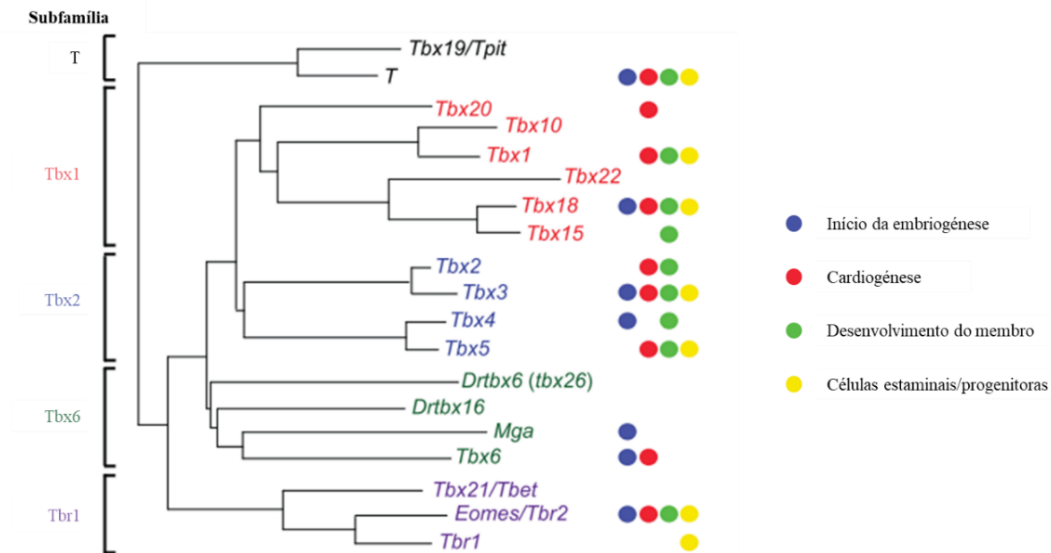


Figura 5 - Árvore filogenética da família de genes T-box de vertebrados mostrando a relação dos genes nas cinco subfamílias indicadas à esquerda. Alguns dos genes representados contribuem para o desenvolvimento embrionário nas suas fases mais iniciais (círculo azul), para a cardiogênese (círculo vermelho), para o desenvolvimento dos membros (círculo verde) e para o desenvolvimento de células estaminais/progenitoras (círculo amarelo). Todos os genes estão presentes em mamíferos à exceção de *Drtbx6* e *Drtbx16* de peixe-zebra, que não têm ortólogos em mamíferos (adaptado de X (58)).

Os elementos da família Tbx desempenham várias funções ao longo do desenvolvimento embrionário sendo cruciais para a formação de determinados tecidos, órgãos e/ou sistemas (58). *Tbx1*, *Tbx10*, *Tbx15* e *Tbx22* contribuem para o desenvolvimento craniofacial. Por exemplo, *Tbx1* é expresso no ouvido interno e é um regulador a montante de *Esrrb*, o qual participa no controlo da especificação destas células. Mutações neste gene impedem a sua ligação com proteínas co-reguladoras específicas cessando o desenvolvimento do ouvido interno em ratinho (59). Outro exemplo, é a expressão altamente restrita do mRNA de *Tbx10*, uma vez que exibe um padrão espaço-temporal único durante o desenvolvimento do rombencéfalo em ratinho (60). *Tbx15* também desempenha um papel importante no desenvolvimento, neste caso, do membro, da coluna vertebral e da cabeça, controlando o número de células precursoras mesenquimais e de condrócitos (61). *Tbx22* apresenta um papel fundamental na formação óssea intramembranosa do palato duro posterior de ratinho sendo essencial para o desenvolvimento e função normais do palato (62). *Tbr1* e *EOMES* contribuem para o desenvolvimento do cérebro, sendo que *Tbr1* regula coordenadamente a identidade regional e laminar de neurónios corticais pós-mitóticos em ratinhos (63). O fator de

transcrição EOMES é expresso em células progenitoras corticais da zona subventricular embrionária e a sua inativação condicional durante o desenvolvimento inicial do cérebro causa microcefalia e graves défices comportamentais em ratinhos mutantes (64). A expressão de EOMES também pode substituir a sinalização de Wnt na diferenciação de mesendoderme (65); Tbx 2 e Tbx3 contribuem para o desenvolvimento das glândulas mamárias (66,67); Tbx19 contribui para o desenvolvimento da glândula pituitária (68); a expressão de Tbx1 na mesoderme e no epitélio contribui para o desenvolvimento do timo e a sua ausência causa defeitos graves na faringe e no sistema cardiovascular (69); Tbx4 e Tbx5 contribuem para o processo de desenvolvimento e ramificação do pulmão e para o desenvolvimento da traqueia (70), entre outras contribuições.

O primeiro fator de transcrição da família T-box a ser descrito foi Brachyury (T), cujo nome provém do grego e significa “cauda curta”. Esta denominação foi atribuída devido à observação de caudas curtas e desenvolvimento axial incompleto em ratinhos pela deleção de um dos alelos de T (T/T-) (71). A deleção dos dois alelos de Brachyury (T-/T-) resulta na morte intrauterina de ratinhos ao fim de, aproximadamente, 10 dias de gestação dada a incapacidade de concluir o seu desenvolvimento embrionário (49).

O gene que codifica para o fator de transcrição Brachyury (T) denomina-se TBXT e localizando-se no braço longo (q) do cromossoma 6 na posição 27 (6q27) do genoma humano (71). Devido a *splicing* alternativo, a transcrição de TBXT resulta em quatro isoformas diferentes de transcritos, denominados de TBXT-203 com 2230 pares de bases (bp), TBXT-201 (2436 bp), TBXT-202 (2250 bp) e TBXT-204 (902 bp). As proteínas resultantes dos transcritos TBXT-203, TBXT-201, TBXT-202 e de TBXT-204 têm 436, 435, 377 e 243 aminoácidos, respetivamente (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000164458;r=6:166157656-166168700) (93). A isoforma mais estudada até à data é TBXT-201, cuja proteína tem, aproximadamente, 47 kDa (<https://www.uniprot.org/uniprot/O15178-1>) (94).

Quanto à sua estrutura proteica, T apresenta um domínio de ligação às cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA), após o reconhecimento da sequência *consensus* de nucleótidos TCACACCT, dois domínios de ativação transcricional e dois domínios de repressão transcricional (Figura 6) (58). T desempenha funções durante a gastrulação regulando a formação da região posterior da mesoderme e o desenvolvimento da

notocorda (56). Para além destas, foram identificadas outras funções dos genes ortólogos de T tais como na diferenciação da notocorda, na migração de células normais durante a gastrulação, no desenvolvimento axial e no estabelecimento da assimetria corporal esquerda/direita (56).

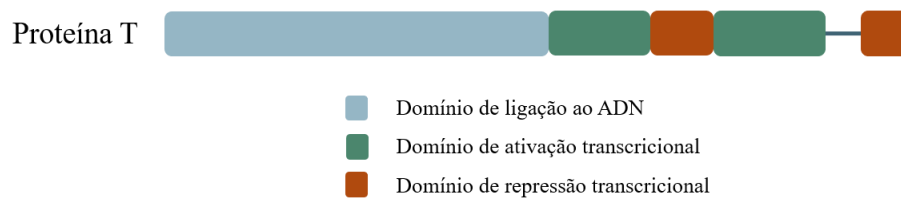


Figura 6 - Representação esquemática dos domínios funcionais de Brachyury (T) (esquema adaptado de Papaioannou, 2014 (58)).

1.4.1. Brachyury na Gastrulação

Tal como supramencionado, Brachyury (T) tem uma participação essencial no início da gastrulação durante a embriogénese em tecidos normais, tendo sido detetado pela primeira vez na linha primitiva, nas suas células mesodermiais adjacentes e na ectoderme próxima à mesma em ratinho (72). À medida que a gastrulação decorre, a expressão de Brachyury estende-se ao longo da linha primitiva em direção à extremidade distal do embrião persistindo na notocorda em embriões de ratinho com 8,5 e 9,5 dias. Depois disso, passando a ser expressado apenas na notocorda (72). Terminada a gastrulação, T deixa de ser detetado na mesoderme lateral e restringe-se ao nó de Hensen e à notocorda ainda em formação (72).

Ensaio anteriores de marcação proteica para o estudo do padrão de expressão de T em embrião de galinha inteiro mostram que, no início da sua formação (HH2-3), o seu homólogo (Ch-T) é expresso na linha primitiva, estendendo-se desde a região posterior da blastoderme até, aproximadamente, ao meio da área pelúcida. Em HH5, Ch-T é fortemente expresso na notocorda, continuando a ser expresso na linha primitiva e na mesoderme em formação. Em HH6, o nó de Hensen regride e o eixo axial progride, sendo que a expressão de Ch-T anterior ao nó é restrita à notocorda. A região posterior da linha primitiva é delimitada pela área opaca, sendo que esta contém células que expressam Ch-

T (Ch-T⁺). Em HH14, a linha primitiva desaparece e é substituída pelo *tailbud* (extremidade da cauda) e Ch-T mantém a sua expressão na notocorda, bem como na mesoderme paraxial pré-somítica. Em estádios HH15, a expressão de Ch-T começa a diminuir na notocorda, à exceção da sua região caudal e do *tailbud*. Em embriões HH21, Ch-T apenas é detetado numa pequena região da cauda da notocorda (73).

Estudos feitos em *Xenopus* por hibridação *in situ* demonstraram que o padrão de expressão dos transcritos do gene homólogo de T (Xbra) é fortemente detetado nas margens do embrião que contém células embrionárias destinadas a tornarem-se mesoderme e em células do centro da blástula. Não é possível afirmar que Xbra é expresso em todas as células destinadas à mesoderme, mas os dados deste estudo mostram que os seus transcritos estão presentes em todo o eixo dorsoventral. Com exceção da notocorda, as células mesodérmicas que migraram anteriormente não expressam o gene, e a comparação com estádios anteriores sugere que estas regularam negativamente a transcrição de Xbra. Este padrão de expressão persiste durante os estádios seguintes até ao momento antes de se tornar gástrula. No tronco e nas regiões anteriores, apenas a notocorda expressa Xbra, mas na região ao redor do blastóporo, onde a involução das células mesodérmicas continua, os transcritos de Xbra continuam visíveis. Para confirmar os resultados da hibridização *in situ*, foram dissecados embriões de *Xenopus* de estadio 8 nas regiões animal, equatorial e vegetal cultivando-os até estadio 11. A expressão de Xbra foi analisada e, como esperado, os transcritos de Xbra não foram detetados em regiões polares de animais ou vegetais, tendo sido alta em explantes equatoriais (74).

1.4.2. Brachyury na diferenciação da mesoderme

Brachyury (T) é um gene regulador crucial na formação da mesoderme durante o desenvolvimento embrionário inicial. A indução do mesoderme começa durante a gastrulação (3). Foi demonstrado que a perda completa de T leva à letalidade embrionária ao décimo dia de gestação (72). Um estudo demonstrou que ao baixar experimentalmente os níveis da expressão de T em embriões de ratinho ocorriam defeitos esqueléticos axiais causados pela apoptose celular da mesoderme paraxial, malformações uroretais e regressão caudal (75). Além destes, ocorre uma redução dos níveis de expressão de T na notocorda que faz com que esta perca a sua capacidade de atuar como um centro de

sinalização e a sua diferenciação é prejudicada acabando por desaparecer. Apesar das consequências observadas, baixos níveis de T no *tailbud* revelaram-se suficientes para a alongação do eixo do embrião (75).

Brachyury é importante para a formação da mesoderme e para a sua diferenciação em células do sistema circulatório. Por exemplo, Brachyury ativa diretamente um conjunto de reguladores hematopoiéticos (Mix11, Mllt3, NKX2-3, Sox6, POU4F1 e CD93) importantes para a formação de hemácias e a sua ausência resulta em defeitos a jusante na hematopoiese em fases posteriores de desenvolvimento de ratinho (76). Sendo importante para a formação da mesoderme e para a sua diferenciação, Brachyury tem também influência no processo da somitogénese. Por exemplo, Brachyury tem um papel funcional na regulação da via canónica Wnt necessária para manter as células progenitoras da mesoderme posterior durante o crescimento do embrião, bem como na regulação somitogénese (76).

Sabe-se que o hómologo de T em *Xenopus* (Xbra) é expresso em células progenitoras de mesoderme em torno do blastocélio e, por fim, na notocorda. Esta expressão é observada tanto num ambiente indutor de mesoderme como em resposta à ativação das vias de sinalização da activina A e do fator de crescimento fibroblástico (FGF) (74).

Evidências recentes de várias espécies de vertebrados indicam que a indução da mesoderme continua após a gastrulação em progenitores neuromesodérmicos (NMPs) dentro do *tailbud*. Os NMPs são células que dão origem às regiões posteriores do sistema nervoso central, incluindo a espinal medula, formam-se durante a gastrulação e apresentam uma bipotência, isto é, uma capacidade para formar linhagens celulares neurais e mesodérmicas (77).

1.4.3. Interatores moleculares de T específicos de mesoderme e de endoderme

Apesar de existirem resultados descritivos da localização do mRNA e da proteína de Brachyury em alguns modelos animais (ratinho, *Xenopus*, mosca da fruta, *zebrafish*), as vias de sinalização que decorrem ao longo da embriogénese e a interação de T com outros co-fatores ainda não estão completamente claros. Em 2015, Faial e os restantes

colegas usaram dois sistemas *in vitro* de células estaminais embrionárias humanas com características semelhantes às das regiões anterior e posterior da linha primitiva inicial para estudar o efeito da interação de T com diferentes proteínas. A partir destas duas populações desenvolverem-se duas linhagens de células progenitoras de endoderme e de mesoderme e estudando-as observou-se que Brachyury apresentava uma interação direta com SMAD 2/3 e com SMAD 1, respetivamente. As SMADs são uma família de proteínas efetoras que atuam, geralmente, dentro do núcleo das células após a ativação da via de sinalização de TGF- β , contribuindo para a indução da expressão de genes que são importantes para processos como a diferenciação e a proliferação celular, entre outros (78)(55).

A sinalização da qual SMAD 1 e Brachyury fazem parte é fundamental não só para uma correta diferenciação mesodérmica das células como também para reprimir uma diferenciação celular endodérmica. Paralelamente, quando a via de sinalização onde SMAD 2/3 participa está ativa, é possível notar que a expressão de Brachyury é suficiente para ativar genes específicos de endoderme nas células. Em suma, sabe-se que Brachyury ativa a expressão de determinados genes dependendo do ambiente em que está inserido, isto é, depende tanto das vias de sinalização que estão ativas como do tipo de células que o expressam (79).

Outro interator molecular de T durante a especificação das células de mesoderme e de endoderme é o fator de transcrição EOMES. Este fator de transcrição também faz parte da família T-box e interage com T aquando da especificação das linhagens celulares de mesendoderme. A mesendoderme é o conjunto de células precursoras que posteriormente darão origem aos folhetos embrionários mesoderme e endoderme (80). Observou-se que a ausência destes dois fatores de transcrição era determinante para que as células estaminais embrionárias de ratinho permanecessem indiferenciadas e no estado de pluripotência não se especificando em células mesendodérmicas. Para além disso, observou-se que a ausência de Eomes e de T levavam a uma eventual diferenciação em células de neuroectoderme mesmo na presença de genes indutores mesendodérmicos e de genes repressores neuroectodermas (TGF- β e Wnt). Neste estudo também foi possível observar que a ausência de Eomes resulta na sobre-expressão de T e dos seus genes alvo, e vice-versa sugerindo uma regulação génica recíproca (80).

Gentsch *et al.* (81) demonstraram que Brachyury, EOMES e VegT mantêm as células estaminais neuromesodérmicas e determinam os seus destinos celulares bipotenciais em embriões de *Xenopus* (81). Estas proteínas T-box são todas recrutadas

para os mesmos locais de reconhecimento genómico, onde ativam genes envolvidos na manutenção de células estaminais e na formação de mesoderme enquanto reprimem genes de neurogénese. A ausência destes fatores de transcrição resulta na formação de tubos neurais demasiado grandes sem derivados mesodérmicos (81). Esta interação entre os membros da família T-box garante assim a formação contínua de tecidos neurais e mesodérmicos com proporções corretas em embriões de vertebrados durante o alongamento axial.

1.5. Hairy1 – Um novo interator proteico de Brachyury

Andrade et al. mostraram que, além da co-localização de T e Hairy1 durante a gastrulação do embrião de galinha, T interage com Hairy1; isto foi visto através de ensaios de *Bimolecular Fluorescent Complementation* (BIFC) e de *Proximity Ligation Assay* (PLA) (dados não publicados). Assim sendo, estes resultados sugerem que, além de Hairy1 co-localizar com o marcador mesodermal T, ocorre também uma interação proteica entre os dois durante a gastrulação.

Hairy1 é uma proteína nuclear repressora da transcrição e pertence à família proteica *Hairy and Enhancer of Split* (Hes). Hairy1 desempenha uma função crucial na somitogénese, um evento que ocorre após o início da gastrulação e que se caracteriza pela segmentação da mesoderme pré-somítica (PSM) em vários pares de sómitos. Palmeirim e colaboradores identificaram e caracterizaram *c-hairy1*, um gene homólogo de galinha do gene *hairy* de *Drosophila* (82). De acordo com os seus resultados, *c-hairy1* é fortemente expresso na PSM do embrião da galinha, onde o seu mRNA exhibe ondas cíclicas de expressão cuja periodicidade temporal corresponde ao tempo de formação de um par de sómitos, neste caso, a 90 minutos (Figura 7) (82). O movimento aparente destas ondas devem-se a pulsos coordenados da expressão de *c-hairy1* e não ao movimento celular ao longo do eixo ântero-posterior ou à propagação de um sinal de ativação. Em vez disso, dá-se uma expressão rítmica e autónoma do mRNA de *c-hairy1* impulsionada por um relógio molecular subjacente ligado à somitogénese. Esses resultados forneceram pela primeira vez a existência de um oscilador intrínseco, denominado Relógio Molecular, relacionado com a somitogénese da mesoderme paraxial (82).

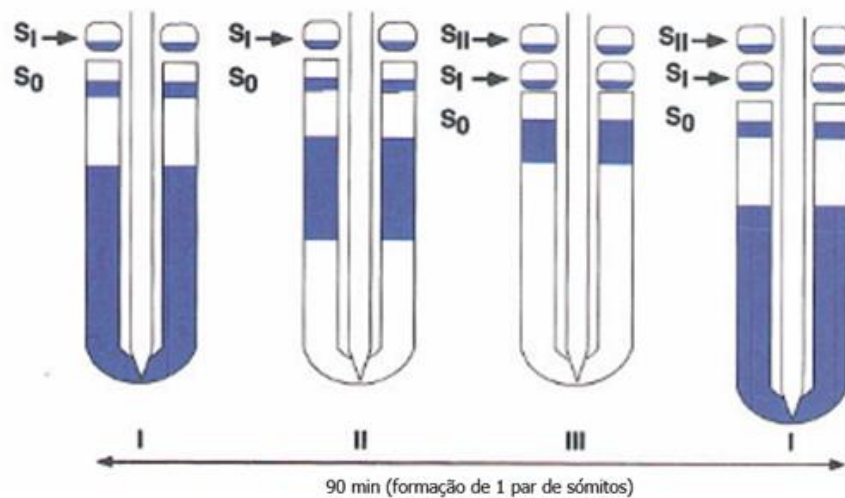


Figura 7 - Expressão cíclica do mRNA de *c-hairy1* na mesoderme pré-somítica durante a somitogênese. Representação esquemática do padrão de expressão do gene da galinha *c-hairy1*. Um par de sómitos forma-se a cada período de 90 minutos devido às oscilações moleculares do relógio molecular (adaptado de Palmeirim et al. 1997 (63)).

No Relógio Molecular, as oscilações transcricionais do mRNA *hairy1* são propagadas como ondas no sentido posterior-anterior que culminam com a formação de um novo par de somitos a cada 90 minutos no embrião de galinha. Durante cada ciclo, células individuais ativam e desativam periodicamente a expressão genética de *hairy1* (83). As oscilações do relógio molecular ocorrem nas células precursoras dos sómitos na região da *tailbud* e ao longo de toda a PSM. Ao longo do eixo ântero-posterior existem duas áreas com diferentes gradientes moleculares de FGF, Wnt e ácido retinóico (RA). Estas áreas correspondem à PSM indeterminada e à PSM determinada, respetivamente, e são separadas pela frente de determinação. O confronto entre as oscilações do relógio molecular e a frente de determinação é necessário para definir a formação do segmento pela indução de *mesp2* na PSM anterior. Níveis elevados de Fgf / Wnt na PSM posterior reprimem a expressão *mesp2*, que é ativado apenas quando os níveis de Fgf / Wnt diminuem (Figura 8) (83).

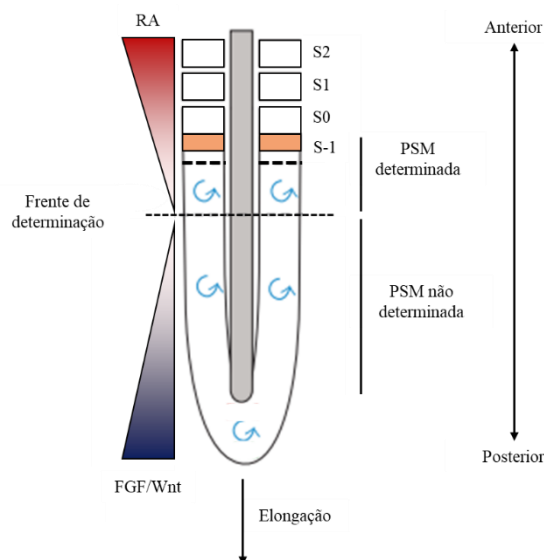


Figura 8 - Esquema representativo dos diferentes gradientes moleculares de FGF, Wnt e ácido retinóico (RA) na mesoderme pré-somítica (PSM) no embrião de galinha. A existência destes gradientes marca as zonas de PSM determinada e não determinada uma vez que o gradiente FGF/Wnt mantém as células num estado indiferenciado, enquanto o gradiente de RA impulsiona a diferenciação das células da PSM em sómitos. PSM, mesoderme pré-somítica; S0, sómito em formação; S-1, sómito que será formado após a formação de S0; S1 e S2, sómitos formados recentemente (adaptado de Resende, 2014 (89)).

Existem sete membros na família Hes, Hes1-7, que se expressam em vários tecidos e desempenham muitos papéis, principalmente no desenvolvimento. Todas as proteínas Hes têm três domínios conservados: domínios básicos HLH (bHLH), Orange e WRPW (Figura 9). A região básica (b) liga-se às sequências de DNA alvo, enquanto a região HLH forma homo e heterodímeros com outras proteínas que também tenham o domínio bHLH, o domínio Orange é responsável por selecionar proteínas durante a formação de heterodímeros e o domínio WRPW recruta proteínas co-repressoras (84).



Figura 9 - Estrutura e domínios conservados das proteínas Hes. Os domínios básico (verde), HLH (lilás), Orange (laranja) e WRPW (azul) são indicados (adaptado de Kageyama, 2007 (84)).

Além do papel das proteínas Hes na somitogênese, os osciladores moleculares desempenham papéis importantes noutros contextos. Nomeadamente, observou-se que a dinâmica de expressão de Hes1 desempenha um papel crucial no desenvolvimento e

destino celular de células estaminais embrionárias e células progenitoras neurais (84). No desenvolvimento do sistema nervoso, as proteínas Hes são fundamentais para a diferenciação de células estaminais neurais de ratinho. Neste caso, Hes1 oscila com um período de 2-3 horas, sendo a sua oscilação crucial para a manutenção dos progenitores neurais pela ativação da sinalização de Notch (85).

Alguns estudos científicos sugerem que a sobre-expressão de genes da família *Hairy-enhancer-of-split* (Hes) também pode ter impacto na tumorigênese e no prognóstico de pacientes dependendo do tipo de cancro. Alguns investigadores observaram que Hes1 pode ter um papel importante para a autorrenovação de células estaminais cancerígenas, para a formação de metástases, para a indução da transição epitélio-mesenquimal e para a resistência a terapias anti-tumorais em cancros colorretais (90, 91). Além destes, a inativação de Hes1 tem um efeito positivo na redução da proliferação de células tumorais e indução da diferenciação de células epiteliais em tumores intestinais, sugerindo Hes1 como alvo promissor na terapia contra estes cancros (88). Estas evidências mostram que as proteínas Hes podem promover a proliferação de células tumorais e a formação de metástases em alguns tumores.

No entanto, existem estudos que indicam também o oposto. Tendo o objetivo de investigar se os níveis de expressão de Hes1 estariam associados ao prognóstico de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), um grupo de investigadores correlacionou os resultados obtidos pela técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT) com os resultados obtidos pela avaliação da saúde de 40 pacientes com LMA (89). Observaram que o grupo de pacientes com elevada expressão de Hes1 teve em média mais tempo de vida após o diagnóstico da doença, assim como mais tempo de sobrevida livre de recaídas após terminar o tratamento quando comparado com o grupo de pacientes cuja expressão de Hes1 era mais baixa (89). Noutro estudo, foi possível observar que o silenciamento de um gene regulador negativo de Hes1, micro-RNA-9 (miR-9), promove a suspensão da proliferação das células tumorais de LMA *in vitro* assim como a apoptose das mesmas. Além destes resultados, observou-se também no mesmo estudo um efeito positivo na prolongação de vida de ratinhos que haviam sido injetados com células tumorais o mesmo tipo de cancro (90).

1.6.Objetivos

Como referido anteriormente, T é um potencial gene supressor tumoral em tumores de tecidos derivados da neuroectoderme embrionária, tais como os gliomas (44). O nosso grupo de investigação possui dados preliminares que sugerem que a expressão de T está associada à diferenciação do tecido neuronal, e mostrou que T e Hairy1 interagem durante a gastrulação embrionária (dados não publicados). Estes resultados e os dados disponíveis na literatura, sugerem as hipóteses de que T tem um papel na diferenciação do tecido neural e de que o mesmo poderá desempenhar funções diferentes em tecidos distintos por interação com Hairy1.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo caracterizar a expressão de T e de Hairy1 nos tecidos embrionários derivados de neuroectoderme da galinha ao longo do tempo por imunohistoquímica. Além deste, este trabalho também teve como propósito avaliar as formas proteicas de T e de Hairy1 nos mesmos tecidos ao longo do desenvolvimento embrionário.

2. Procedimentos Experimentais

2.1. Imunohistoquímica

2.1.1. Recolha das amostras biológicas

A recolha das amostras biológicas foi feita a partir de ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus*) adquiridos à Pintobar – Exploração Avícola (Braga). Estes foram incubados numa atmosfera humidificada (49%) e à temperatura de 38°C, por diferentes períodos de tempo desde 40 horas até 7 dias. Posteriormente, os embriões foram recolhidos através de técnicas de microdissecção a partir de uma incisão na casca do ovo e lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x para retirar o excesso de gema. De seguida, foram colocados e fixados num suporte de fundo negro com PBS 1x para manter a integridade dos tecidos das amostras biológicas e visualizados com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss). Obtiveram-se embriões com estadios entre HH11 e HH38 de acordo com o estadiamento estabelecido por Hamburger e Hamilton (91). Posteriormente, os tecidos foram fixados com uma solução fixadora de formaldeído (4% em PBS 1x) para preservar as suas características ao longo do tempo.

2.1.2. Detecção da localização proteica por imunohistoquímica

As amostras biológicas para a realização da técnica de imunohistoquímica foram recolhidas tal como descrito anteriormente. Após fixação, os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes histológicos efetuados pela equipa do serviço de histologia do ICVS. Os cortes foram montados em lâminas Superfrost® Plus para serem posteriormente analisadas por imunohistoquímica para deteção das proteínas Brachyury e Hairy1. A cada embrião foram retirados 6 cortes histológicos correspondendo estes a 6 réplicas experimentais da mesma amostra, todos com uma espessura de 4 µm, tendo sido distribuídos de forma seriada por cada par de lâminas (Figura 10). Em cada lâmina, foram colocados cortes histológicos de dois embriões diferentes, mas com o mesmo estadio para aumentar o número das réplicas biológicas. No entanto, isso só foi possível em embriões até HH17, uma vez que a partir de HH19 os embriões eram demasiado grandes para o tamanho das lâminas utilizadas.

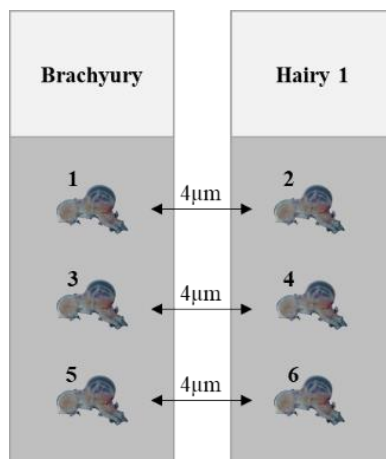


Figura 10 - Esquema representativo da distribuição dos cortes histológicos de cada amostra biológica são distribuídos ao longo de cada duas lâminas.

Primeiramente, aqueceram-se as lâminas na estufa a 65°C durante 15 minutos para remover a maioria dos resíduos de parafina. Seguidamente, procedeu-se à desparafinação das amostras para remover a parafina que ainda ficou aderida às lâminas. Este procedimento foi automaticamente executado pelo equipamento Leica AutoStainer XL. De seguida, foi realizada a recuperação dos epítomos dos antígenos das proteínas mergulhando as lâminas numa solução de tampão citrato 10 mM (Sigma Aldrich) previamente aquecida no micro-ondas à potência de 800W por 5 minutos e depois à potência de 250W por 20 minutos. Para bloquear o máximo de peroxidases endógenas e minimizar a ocorrência de marcação inespecífica, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogénio (H₂O₂, Carlo Erba Reagents) 3% por 20 minutos utilizando folha de alumínio para proteger as amostras da luz; seguidamente foram lavadas em água destilada por 5 minutos, e duas vezes em solução de PBT (PBS 1x e Tween20 0,1%) (Tween20, Panreac) por 5 minutos. De seguida, utilizou-se o kit comercial UltraVision Detection System (Thermo Fisher Scientific, EUA). De modo a bloquear qualquer ligação antigénica inespecífica, adicionaram-se cerca de 150 µL da solução comercial *V-block* a cada lâmina por apenas 5 minutos e sem exceder esse período. Posteriormente, retirou-se o excesso de *V-block* e adicionou-se o anticorpo primário anti-T e anti-H1, incubando as lâminas horizontalmente a 4°C, protegidas da luz, durante pelo menos 16 horas (*overnight*). Os anticorpos primários foram previamente diluídos na solução Antibody Diluent OP Quanto (Thermo Fisher Scientific) (sc-20109, 1/200 e #7645_P, 1/500). Para deteção de Brachyury utilizou-se o anticorpo comercial sc-20109 (Santa Cruz, EUA). Para deteção de Hairy1 utilizaram-se dois anticorpos distintos, produzidos por

encomenda direta do nosso grupo de investigação. Nomeadamente, um anticorpo monoclonal (8C9) levantado em ratinho contra a proteína recombinante de galinha, e um anticorpo policlonal (#7645) produzido em coelho contra um péptido de Hairy1.

Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas quatro vezes em PBT e, seguidamente, foram aplicados cerca de 150 uL da solução comercial *Biotinylated goat anti-polyvalent* que reconhece os anticorpos primários. Esta incubação foi feita à temperatura ambiente por um período de 10 minutos. Após este período, foram realizadas três lavagens com a PBT e, de seguida, aplicaram-se 150 uL da solução comercial *Strept Peroxidase* a cada lâmina. Para revelar a localização das proteínas estudadas foi utilizado o DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Thermo Fisher Scientific). Incubaram-se as lâminas, à temperatura ambiente, com 150 µL DAB/lâmina durante 2, 5, 7 e 10 minutos. Parou-se a reação de revelação lavando as lâminas 2 vezes em PBS 1x. Finalmente, a contracoloração com hematoxilina foi realizada automaticamente pelo equipamento Leica AutoStainer XL. A hematoxilina tinge de cor azul os núcleos, enquanto a reação com o DAB dá origem a uma coloração castanha indicando a localização das proteínas de interesse.

A montagem das lâminas foi realizada manualmente na *hotte* de modo a proteger as vias respiratórias. Colocaram-se três gotas de Entellan (Merck, Alemanha) em cima de uma lâmina com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e, por fim, colocou-se lenta e cuidadosamente uma lamela no topo para que não se formassem bolhas de ar. Antes de serem observadas ao microscópio, permaneceram à temperatura ambiente por 2 horas no mínimo para que a solução de montagem solidificasse.

2.2. Análise proteica por *Western blot*

O método *western blot* é uma técnica que permite a deteção de proteínas específicas presentes numa mistura proteica complexa, obtida a partir de células ou tecidos. As proteínas são separadas por tamanho através de eletroforese em gel, em condições desnaturantes, e de seguida transferidas para uma membrana. Posteriormente, a membrana é incubada com um anticorpo primário contra a proteína de interesse que é então reconhecido por um anticorpo secundário acoplado a uma enzima. Finalmente, na presença de substratos adequados, ocorre a reação enzimática e o produto é detetado por um sistema de imagem. Essa técnica permite a quantificação de proteínas com diferentes

níveis de expressão em um mesmo *blot*. Além disso, para normalização dos resultados, utiliza-se proteínas que apresentam expressão constitutiva, como a β -tubulina, como controlo de carga (*loading control*).

2.2.1. Recolha das amostras biológicas

As amostras biológicas para a extração de proteína total e realização da técnica de *western blot* foram recolhidas a partir de ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus*) adquiridos à Pintobar – Exploração Avícola (Braga), à semelhança da técnica de imunohistoquímica mencionada anteriormente. Os embriões foram colocados e fixados num suporte de fundo negro com PBS 1x para manter a integridade dos tecidos das amostras biológicas, foram caracterizados com recurso a um estereomicroscópio (Zeiss) e imediatamente colocados em gelo. Obtiveram-se embriões com estadios entre HH25 – HH32 de acordo com o estadiamento estabelecido por Hamburger e Hamilton (91). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 60 segundos (*spin-down*) para remover todo o PBS, congeladas num banho de azoto líquido e colocadas a -80°C para preservar as suas características ao longo do tempo.

2.2.2. Extração e quantificação proteína

Após o seu descongelamento, foi realizado um *spin-down* às amostras para remover o excesso de PBS. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise específico (Tabela 5), em gelo e com o auxílio de um homogeneizador (Kontes Glass, EUA), durante 4 ciclos de 15 segundos cada, à velocidade máxima intercalados com igual período em gelo para evitar o sobreaquecimento e a consequente degradação proteica. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 30 minutos, a 4°C . Terminada a centrifugação, foram recolhidos os sobrenadantes e mantidos a -80°C para posterior quantificação proteica.

Tabela 4 - Soluções e respetivos volumes requeridos para a preparação do tampão de lise.

Preparação do Tampão de Lise	
Solução	Volume
HEPES, pH 7,5, 100 mM, -20°C (Sigma Aldrich)	200 µL
Glicerolfosfato, 200 mM (Sigma Aldrich)	250 µL
EGTA, 10 mM (Sigma Aldrich)	200 µL
Glicerol (Sigma Aldrich)	100 µL
Vanadato de Sódio, 100 mM (Sigma Aldrich)	10 µL
1% Triton X-100 (Sigma Aldrich)	10 µL
<i>Complete protease inhibitor cocktail</i> , -20°C (Sigma Aldrich)	10 µL
Água destilada	220 µL
Volume Total	1 mL

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford. O método colorimétrico do Reagente de Bradford é um ensaio que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (BioRad, EUA) que, em condições acídicas, liga-se às proteínas dando origem a complexos azulados. Este corante reage com resíduos de aminoácidos básicos nas proteínas alterando o máximo de absorção de 465 para 595 nm (comprimento de onda utilizado para a deteção). A quantificação proteica das amostras para o ensaio de Bradford exigiu a elaboração de uma curva padrão com concentrações conhecidas da proteína albumina bovina (BSA) (BioRad), nomeadamente de 0,1 a 0,7 µg/µL. Cada solução padrão foi medida em duplicado num espectrofotómetro e a média das absorvâncias foi utilizada para, através de uma regressão linear, obter a curva padrão. As diferentes amostras foram lidas também em duplicado e a concentração de proteína total determinada pela equação de regressão linear.

2.2.3. SDS-PAGE

Para separar as proteínas consoante o seu tamanho foi utilizada a técnica de eletroforese em gel desnaturante. Os géis foram preparados com *sodium dodecyl sulfate* (SDS) que reveste as proteínas com carga negativa e favorece a desnaturação das proteínas permitindo assim que migrem de acordo com o seu peso molecular (estrutura primária). As amostras foram preparadas com tampão Laemmli comercial (Bio-Rad,

EUA) misturado com β -mercaptoetanol (Sigma) para garantir a redução das pontes bissulfureto, e desnaturadas a 100°C durante 15 minutos.

Carregaram-se 10 μ g de proteína total num gel de 10% de acrilamida sendo submetidos à eletroforese a voltagem constante (100 V), durante aproximadamente 2 horas, na Mini-PROTEAN Tetra Cell vertical (Bio-Rad). O gel separador (10%) e concentrador (4%) foram preparados de acordo com a tabela 5. De notar que o persulfato de amónio (PSA) e tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram adicionados à mistura no final para acelerar a polimerização.

Tabela 5 - Descrição dos reagentes utilizados, bem como os seus volumes na preparação dos géis de poli-acrilamida para eletroforese, nomeadamente o gel concentrador 4% e o gel separador 10%.

Solução	Preparação do gel de poli-acrilamida para eletroforese	
	Gel concentrador 4% (mL)	Gel separador 10% (mL)
Acrilamida 40% (BioRad)	0,5 mL	2,5 mL
Tris-HCl, pH 6,8, 0,5M	1,26 mL	–
Tris-HCl, pH 8,8, 1,5M	–	2,5 mL
SDS 10%	50 μ L	100 μ L
Água ultrapura	3,18 mL	4,85 mL
TEMED (BioRad)	5 μ L	5 μ L
PSA 10%	25 μ L	50 μ L
Volume total	5 mL	10 mL

Os géis foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Transblot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit, Bio-Rad) no equipamento de transferência (Transblot Turbo Transfer System, Bio-Rad) por 10 minutos a uma voltagem constante de 18V. Terminada a transferência, as membranas foram incubadas com uma solução corante Ponceau S (0.1% Ponceau S (p/v) em 5% ácido acético) para confirmar a eficácia da transferência. Depois de lavadas com TBST, as membranas destinadas à deteção de Brachyury foram bloqueadas com uma solução de BSA (5%) em TBST; as membranas destinadas à deteção de Hairy1 foram bloqueadas com uma solução de leite em pó (5%) em TBST. De seguida, depois de lavadas com TBST, as membranas foram incubadas

durante a noite, com agitação e a 4°C, com as diferentes diluições dos anticorpos primários. O anticorpo primário anti-T foi preparado em BSA 5% e o anticorpo primário anti-H1 foi preparado em leite 1%. Utilizou-se a β -tubulina (1:200000 em BSA 5%; #ab6046, Abcam Inc., UK) como controlo de carga do gel. Aquando da otimização da deteção da proteína Hairy 1 (H1) por análise de *western blot* em embrião de galinha HH14, o anticorpo primário foi diluído primeiramente em BSA 5% (#7645_P, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000) e, numa segunda abordagem, em leite em pó 1% (#7645_S, 1/1000, 1/2000; #7645_P, 1/1000, 1/2000) para otimizar as condições experimentais.

No dia seguinte, procedeu-se à lavagem das membranas com TBST, e as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com a enzima *horseradish* peroxidase (#7074, Cell Signaling Technology Inc) durante 1 hora, à temperatura ambiente e em agitação. Para deteção do anticorpo primário anti-T, o anticorpo secundário (1/2000) foi diluído em leite em pó 2%. Para deteção dos anticorpos primários contra H1, o anticorpo secundário (1/5000) foi diluído em leite em pó 2% em TBST. Após as lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com o substrato quimioluminescente Clarity (BioRad) durante 5 minutos e à temperatura ambiente. As membranas foram de seguida visualizadas no Sapphire NIR-Q (Azure Biosystems, Inc). A análise quantitativa dos níveis de expressão proteica foi realizada recorrendo ao software AzurSpot (Bio-Rad) e normalizada para os níveis de expressão de β -tubulina.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da expressão de T ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso no embrião de galinha

De forma a caracterizar a expressão de Brachyury (T) nos tecidos derivados de neuroectoderme ao longo do desenvolvimento embrionário de galinha (HH11-37), utilizou-se a técnica de imunohistoquímica. Para tal, utilizaram-se condições previamente estabelecidas no laboratório, nomeadamente uma diluição de 1/200 do anticorpo anti-T (sc-20109, Santa Cruz, EUA). Para confirmar que esta era a diluição mais adequada, foi realizada uma imunohistoquímica em cortes de embrião de galinha de estadio HH15, uma vez que está descrito que T se expressa na notocorda nestes estadios embrionários (73). Foi possível observar expressão de T nas células da notocorda (Figura 11, Ai-iii, asterisco), validando assim a diluição de 1/200 do anticorpo primário anti-T nas condições experimentais do presente estudo. Para além de ser possível observar que T é expresso na notocorda, tal como seria de esperar, também foi possível visualizar a sua expressão no tubo neural no mesmo corte (Figura 11, Aii-iii, cabeça de seta). Paralelamente, realizou-se um controlo negativo (sem anticorpo primário) que não apresentou expressão de T (Figura 11, Bi-iii), tal como seria de esperar.

Aplicaram-se estas mesmas condições na análise da expressão de Brachyury em diversos estadios ao longo do desenvolvimento do embrião de galinha, nomeadamente entre HH11 e HH37 (Figuras 12-15). Foi possível observar que este fator de transcrição é expresso na notocorda e nos sómitos no estadio HH11 (Figura 12, Ai-iii, asterisco e seta a tracejado, respetivamente). Nos estadios HH13 e HH14 é possível observar que T se expressa nas células da notocorda (Figura 12, Biii e Ciii, respetivamente). Em embriões de galinha em estadio HH15, é possível visualizar a expressão de T em células da notocorda e do tubo neural (Figura 12, Di-iii, asterisco e cabeça de seta, respetivamente), e cérebro.

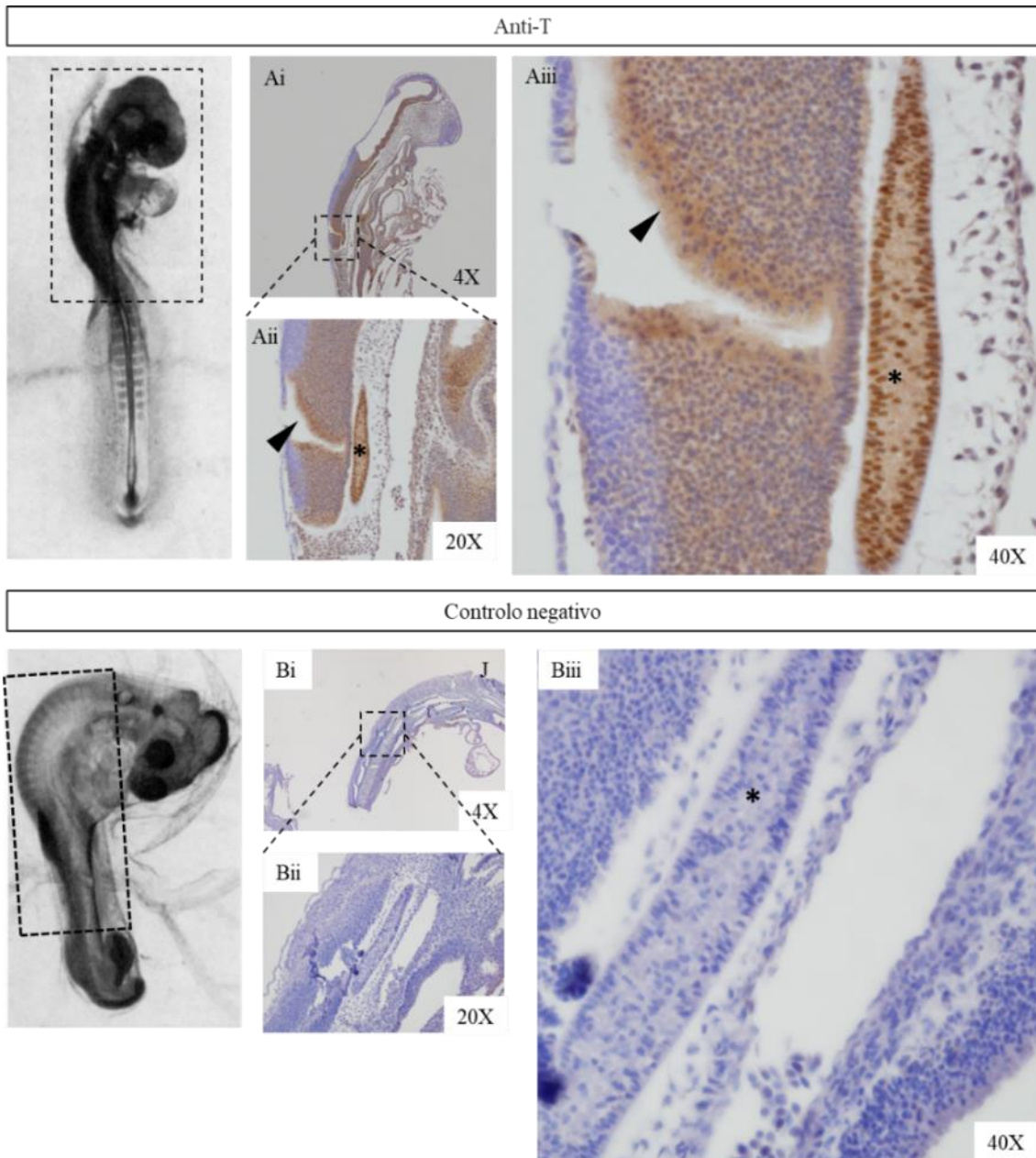


Figura 11 - Otimização da deteção da expressão de Brachyury (T) por imunohistoquímica em embriões de galinha. (Ai-iii) Diferentes ampliações de cortes sagitais de um embrião HH15 marcados com anticorpo primário Anti-T (1/200). (Bi-iii) Controlo negativo; diferentes ampliações de cortes sagitais de um embrião HH19 marcados na ausência de anticorpo primário. Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Asterisco, notocorda; cabeça de seta, tubo neural.

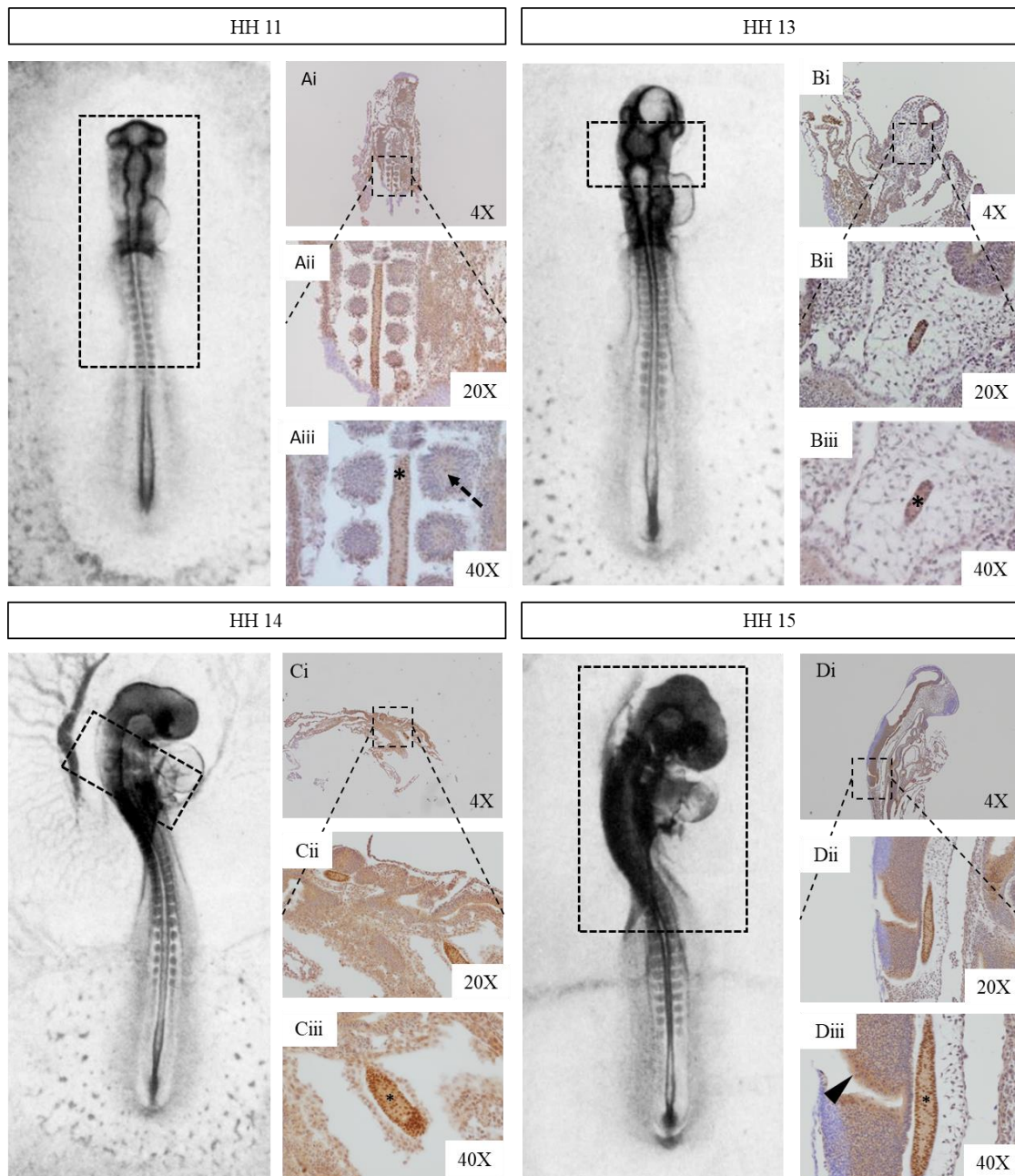


Figura 12 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH11 a HH15. Imagens representativas da detecção de T em cortes de embriões de galinha em HH11 (Ai-Aiii; frontal), HH13 (Bi-Biii; transversal), HH14 (Ci-Ciii; sagital) e HH15 (Di-Diii, sagital) marcados com Anti-T (1/200). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Asterisco, notocorda; cabeça de seta, tubo neural; Seta tracejada, sómito.

Relativamente aos embriões de galinha de estadio HH17, foi detetada a expressão de T no tubo neural (Figura 13, Ai-iii, cabeça de seta). No estadio HH19, T está presente em algumas células do tecido cerebral (Figura 13, Bi-iii, seta). No estadio HH21, verifica-

se que T é expresso em algumas células precursoras do córtex cerebral (Figura 13, Ci-iii, seta).

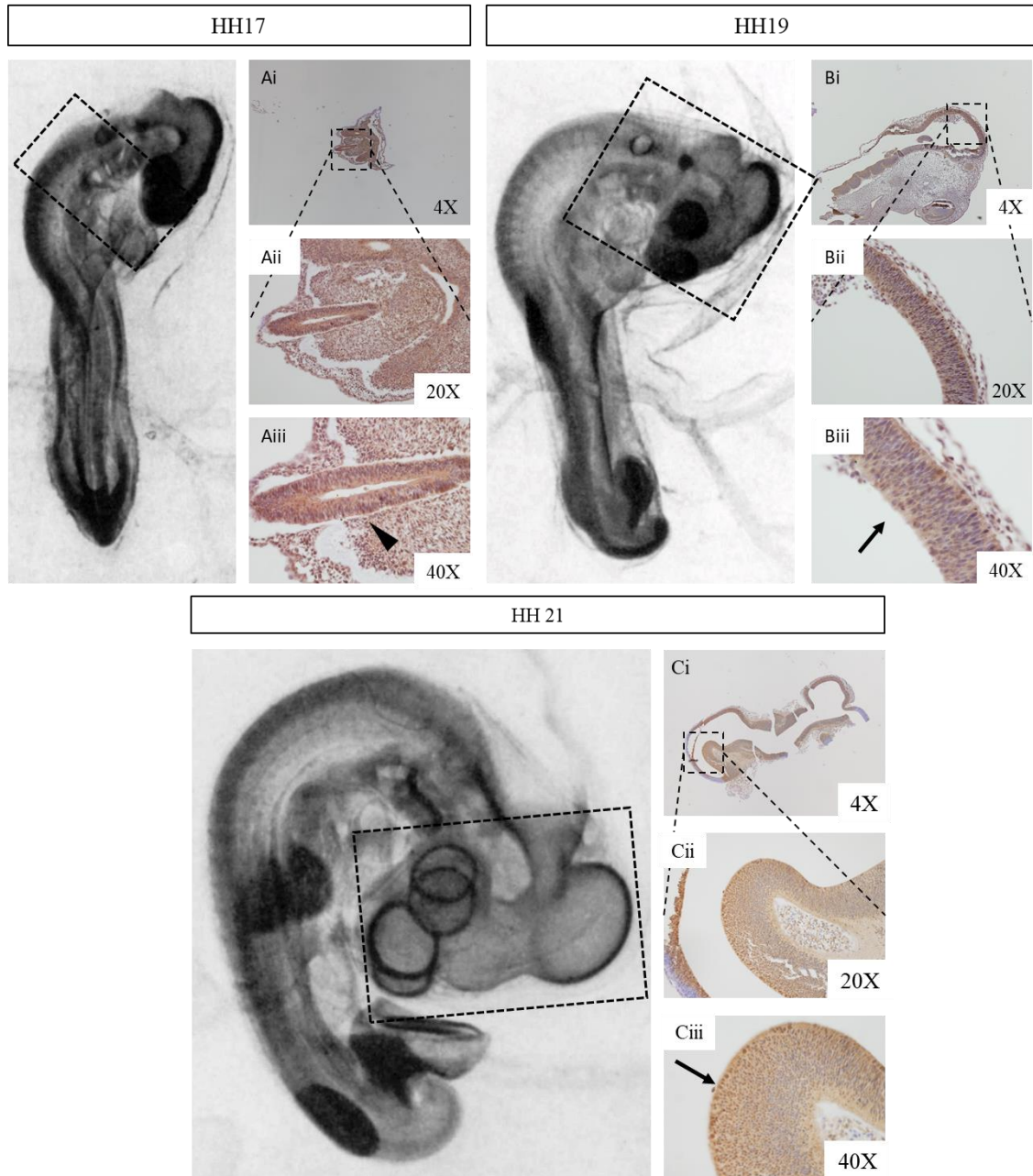


Figura 13 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH17 a HH21. Imagens representativas da detecção de T em cortes de embriões de galinha em HH17 (Ai-Aiii; transversal), HH19 (Bi-Biii; frontal) e HH21 (Ci-Ciii; sagital). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Anti-T (1/200). Cabeça de seta, tubo neural; seta, cérebro.

O padrão de expressão de T no cérebro é semelhante em cortes de embrião de galinha que se encontram em estádios HH23 (Figura 14, Ai-iii), HH25 (Figura 14, Bi-iii) e HH29 (Figura 14, Ci-iii).

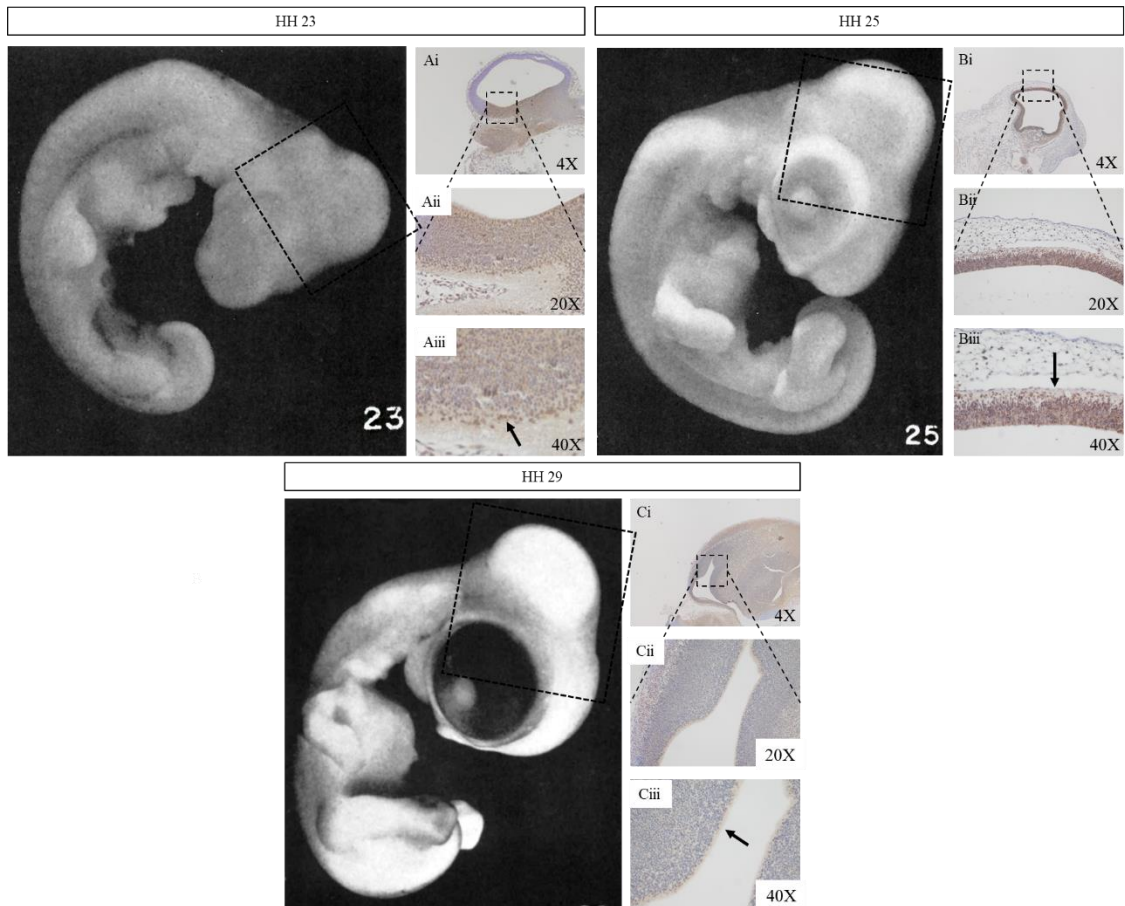


Figura 14 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH23 a HH29. Imagens representativas da detecção de T em cortes de embriões de galinha em HH23 (Ai-Aiii; sagital), HH25 (Bi-Biii; sagital) e HH29 (Ci-Ciii; sagital). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Anti-T (1/200). Seta, cérebro.

Em estádios mais avançados do desenvolvimento, nomeadamente HH35 (Figura 15, Ai-Bi) e HH37 (Figura 15, Ci-Di), verificou-se que T continua a ser expresso nas células precursoras do cérebro e do tubo neural com uma intensidade menor.

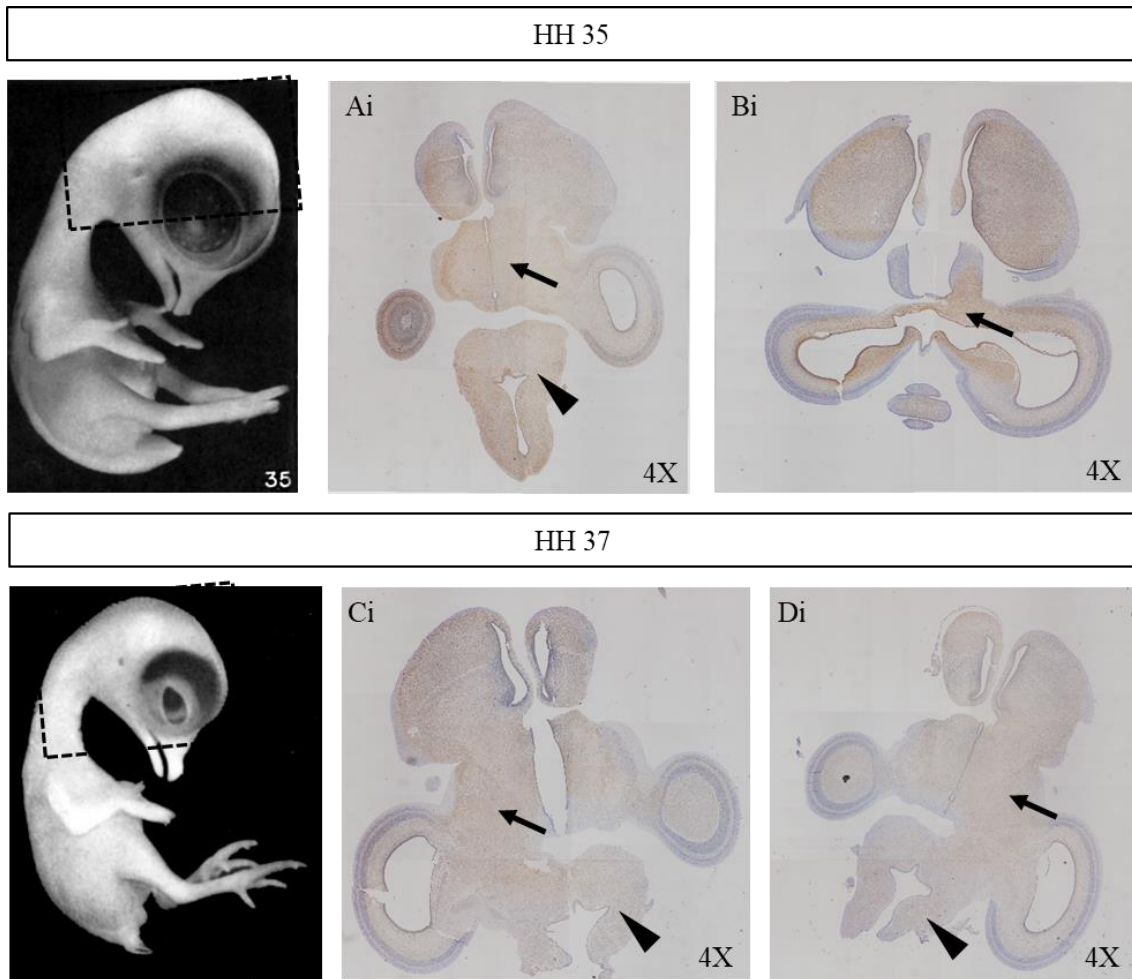


Figura 15 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Brachyury (T) em embriões de galinha entre HH35 a HH37. Imagens representativas da detecção de T em cortes de embriões de galinha em HH35 (Ai e Bi; frontal) e HH 37 (Ci e Di; frontal). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Anti-T (1/200). Cabeça de seta, tubo neural; seta, cérebro.

Está descrito na literatura que T é fortemente expresso no início do desenvolvimento embrionário até ao estadio HH15, diminuindo progressivamente a sua expressão na notocorda, à exceção da sua região caudal e do *tailbud*, depois desse estadio (73). Segundo os nossos resultados, T apresenta forte expressão na notocorda em HH11-15, possivelmente porque é necessário para a formação e diferenciação da mesoderme e da notocorda em embrião de galinha. Além de ser verificada expressão em células da notocorda, também se detetou a presença de T no tubo neural (Figura 12), o qual poderá indicar que pode ser relevante para o desenvolvimento de tecidos derivados de ectoderme.

Seria interessante repetir os mesmos ensaios em embriões mais novos para caracterizar o padrão de expressão de T ao longo de um intervalo de tempo maior no desenvolvimento.

Os nossos resultados mostram também que T é expresso nos sómitos no estadio HH11 (Figura 12). Estes foram resultados dos quais não estávamos à espera de observar, visto que não existe nenhuma descrição dos mesmos na literatura. Apesar disto, é possível que esta expressão ocorra dado que T é marcador específico da mesoderme e os sómitos são estruturas com origem na mesma. A sua deteção poderá ser explicada porque fizemos imunohistoquímica em secções e esta é uma técnica com maior sensibilidade do que a imunohistoquímica *in toto*.

De acordo com a literatura, em embriões HH21, Ch-T apenas é detetado numa pequena região caudal da notocorda (73). No entanto, os nossos resultados apresentam um padrão de expressão gradual de T ao longo dos tecidos do cérebro, apresentando marcação mais forte nas células próximas ao lúmen e marcação menos evidente nas células próximas ao córtex. T encontra-se nitidamente expresso em células que se encontram em divisão celular (Figura 14) o que poderá sugerir que T tem um papel funcional importante para o desenvolvimento de estruturas neurais.

O nosso grupo de investigação possui dados preliminares que demonstram a expressão de T associada à diferenciação do sistema nervoso central. Para ter uma noção mais específica do seu padrão de expressão, seria interessante repetir os mesmos ensaios em cérebro e tubo neural dissecados para caracterizar o padrão de expressão de T especificamente nestes tecidos neurais. De maneira a ter uma visão mais ampla do seu padrão de expressão no desenvolvimento ao longo do tempo, seria importante caracterizar T em embriões mais novos (HH1-HH10) e mais velhos (HH37-HH46). Na Tabela 6, encontram-se representadas estruturas, em diferentes estadios, que apresentavam diferentes níveis de expressão de T.

Tabela 6 – Resumo do padrão de expressão de Brachyury ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37. As estruturas analisadas foram notocorda, sómitos, tubo neural e cérebro. Branco, sem expressão de T (sem marcação). Cinzento, embriões/estruturas não observados/não dissecados (sem dados). Amarelo, expressão de Brachyury (T); o gradiente de cor reflete os níveis de expressão sendo que quanto mais claro, menos se expressa.

Brachyury	HH11	HH13	HH14	HH15	HH17	HH19	HH21	HH23	HH25	HH27	HH29	HH35	HH37
Notocorda	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento
Sómitos	Amarelo	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Cinzento
Tubo neural	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Amarelo	Amarelo	Cinzento	Cinzento	Branco	Branco	Cinzento	Cinzento	Amarelo	Amarelo
Cérebro	Cinzento	Cinzento	Cinzento	Amarelo	Cinzento	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Cinzento	Amarelo	Amarelo	Amarelo

T
 Sem marcação
 Sem dados

3.2. Caracterização da expressão de H1 nos tecidos de embrião de galinha ao longo do desenvolvimento

3.2.1. Otimização da detecção de Hairy1 por imunohistoquímica

De forma a descrever a expressão de Hairy 1 (H1) em tecidos de embrião de galinha ao longo do seu desenvolvimento (HH11-37), recorreu-se à técnica de imunohistoquímica, tal como foi executado para descrever a expressão de T em cortes seriados dos mesmos embriões (capítulo 3.1).

Para determinar qual o anticorpo primário mais adequado para detetar a expressão de Hairy1, foram realizadas otimizações testando dois anticorpos primários diferentes, produzidos por encomenda do nosso laboratório. Foram testadas diferentes diluições do anticorpo primário monoclonal (doravante designado por 8C9) para Hairy 1 (anti-H1), neste caso 1/50, 1/100 e 1/200. Detetou-se expressão de T nas diluições 1/50 e 1/100 (Figura 16, Ai e Aii, respetivamente). Em ambos casos, verificou-se que H1 é expresso no sistema nervoso periférico, possivelmente nos gânglios da raiz dorsal (seta a tracejado), e em tecido de tubo neural (cabeça de seta) de um embrião de galinha em estadio HH24. Não se observou, no entanto, expressão de H1 na diluição 1/200.

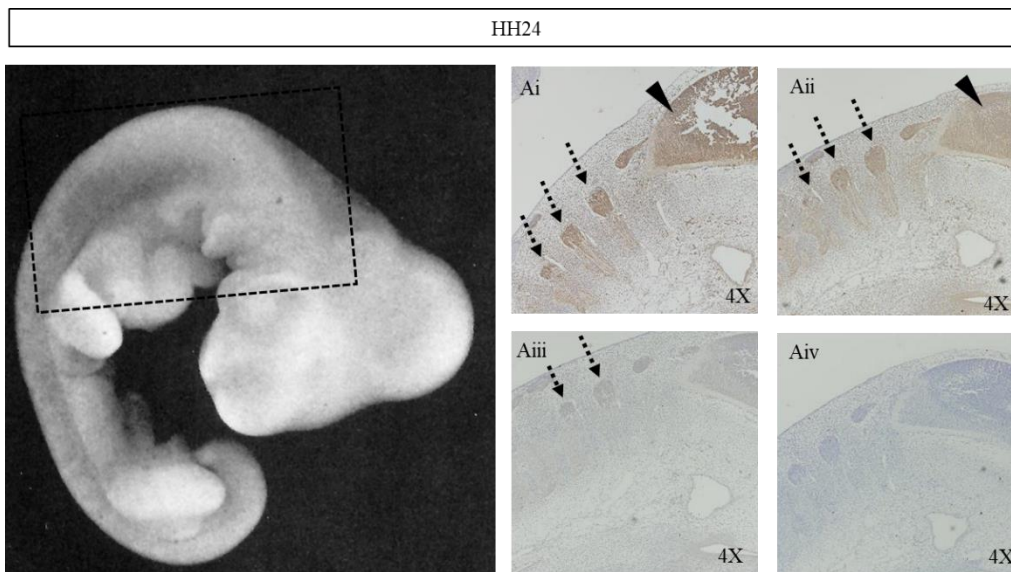


Figura 16 - Otimização da detecção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha. (Ai-iii) Cortes sagitais de um embrião HH24 marcados com anticorpo primário Anti-H1 (anticorpo monoclonal 8C9) em diferentes condições (Ai, 1/50; Aii, 1/100; Aiii, 1/200). (Aiv) Controle negativo; corte sagital de um embrião HH24 na ausência de anticorpo primário. O retângulo na imagem de embrião inteiro (adaptada de 58) representa as regiões analisadas. Seta tracejada, gânglios da raiz dorsal (sistema nervoso periférico); cabeça de seta, tubo neural.

Para validar este resultado, testaram-se as mesmas condições (1/50, 1/100 e 1/200) do anticorpo primário monoclonal 8C9 em cortes de embrião HH24 representativos de outros tecidos/estruturas celulares (Figura 17, Ai-Aiii, respetivamente). Paralelamente ao controlo positivo, foi utilizado um conjunto de cortes sem anticorpo primário de forma a obter o controlo negativo desta experiência (Figura 17, Aiv). Os tecidos observados englobavam a notocorda (asterisco), o tubo neural (cabeça de seta), o miótomo (m), o dermatomo (d) e o esclerótomo (e).

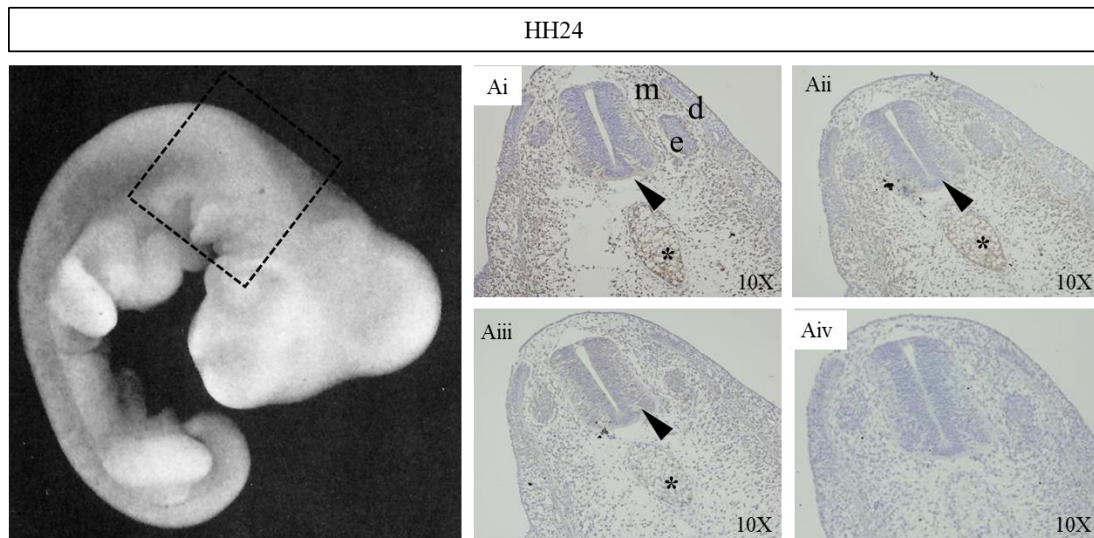


Figura 17 - Otimização da detecção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha. (Ai-iii) Cortes transversais de um embrião HH24 marcados com anticorpo primário Anti-H1 (anticorpo monoclonal 8C9) em diferentes condições (Ai, 1/50; Aii, 1/100; Aiii, 1/200). (Aiv) Controle negativo; corte transversal de um embrião HH24 na ausência de anticorpo primário. O retângulo na imagem de embrião inteiro (adaptada de 58) representa as regiões analisadas. Asterisco, notocorda; cabeça de seta, tubo neural; m, miótomo; d, dermatomo; e, esclerótomo.

Posteriormente, foi avaliado um segundo anticorpo primário, desta vez um anticorpo policlonal (doravante designado por #7645) em cortes de embriões de galinha em estadio HH24. Para tal, foram testadas as condições 1:200 (Figura 18) e 1:500 (Figura 19). Em ambas as condições, foi possível observar a expressão de H1 nas células do cérebro (Figura 18, Ai-iii, Figura 19, Ai-iii, seta), nas células do tubo neural (Figura 19, Bi-iii, cabeça de seta) a nível nuclear e citoplasmático. Paralelamente, foi utilizado um conjunto de cortes sem anticorpo primário de forma a obter o controlo negativo desta experiência (Figura 18).

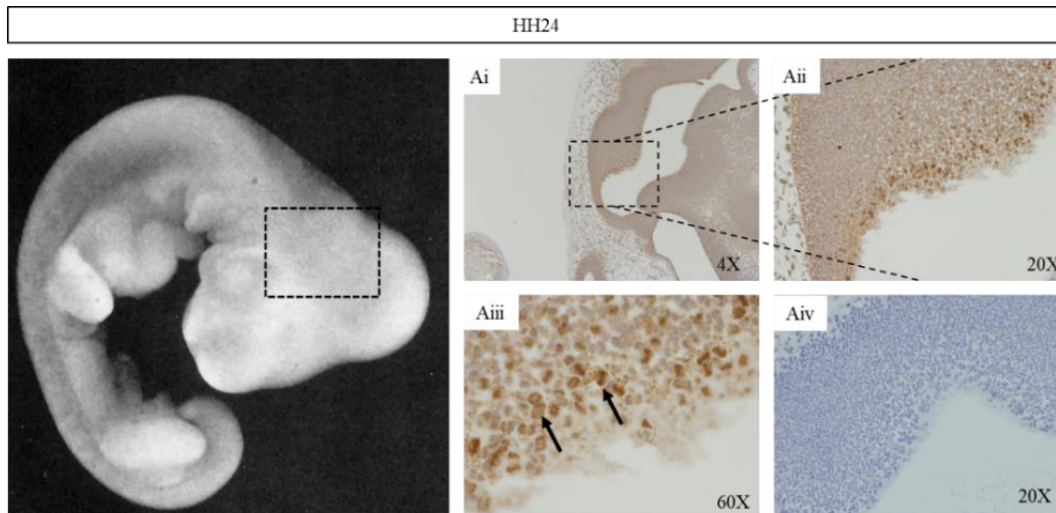


Figura 18 - Otimização da detecção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha. (Ai-iii) Cortes sagitais de um embrião HH24 marcados com anticorpo primário policlonal Anti-H1 (anticorpo policlonal #7645) (1/200). (Aiv) Controle negativo; corte sagital de um embrião HH24 marcado na ausência de anticorpo primário. O retângulo na imagem de embrião inteiro (adaptadas de 58) representa a região analisada. Seta, cérebro.

Tendo em conta os resultados obtidos com os dois anticorpos anti-H1, concluiu-se que o anticorpo primário monoclonal 8C9 não seria o mais indicado para detetar a expressão de H1, uma vez que, para obter a mesma marcação, as condições experimentais iriam requerer um gasto maior de anticorpo primário ao diminuir o fator de diluição. Assim sendo, a caracterização da expressão de H1 ao longo do desenvolvimento embrionário da galinha foi realizada com o anticorpo primário policlonal #7645, diluição 1/500.

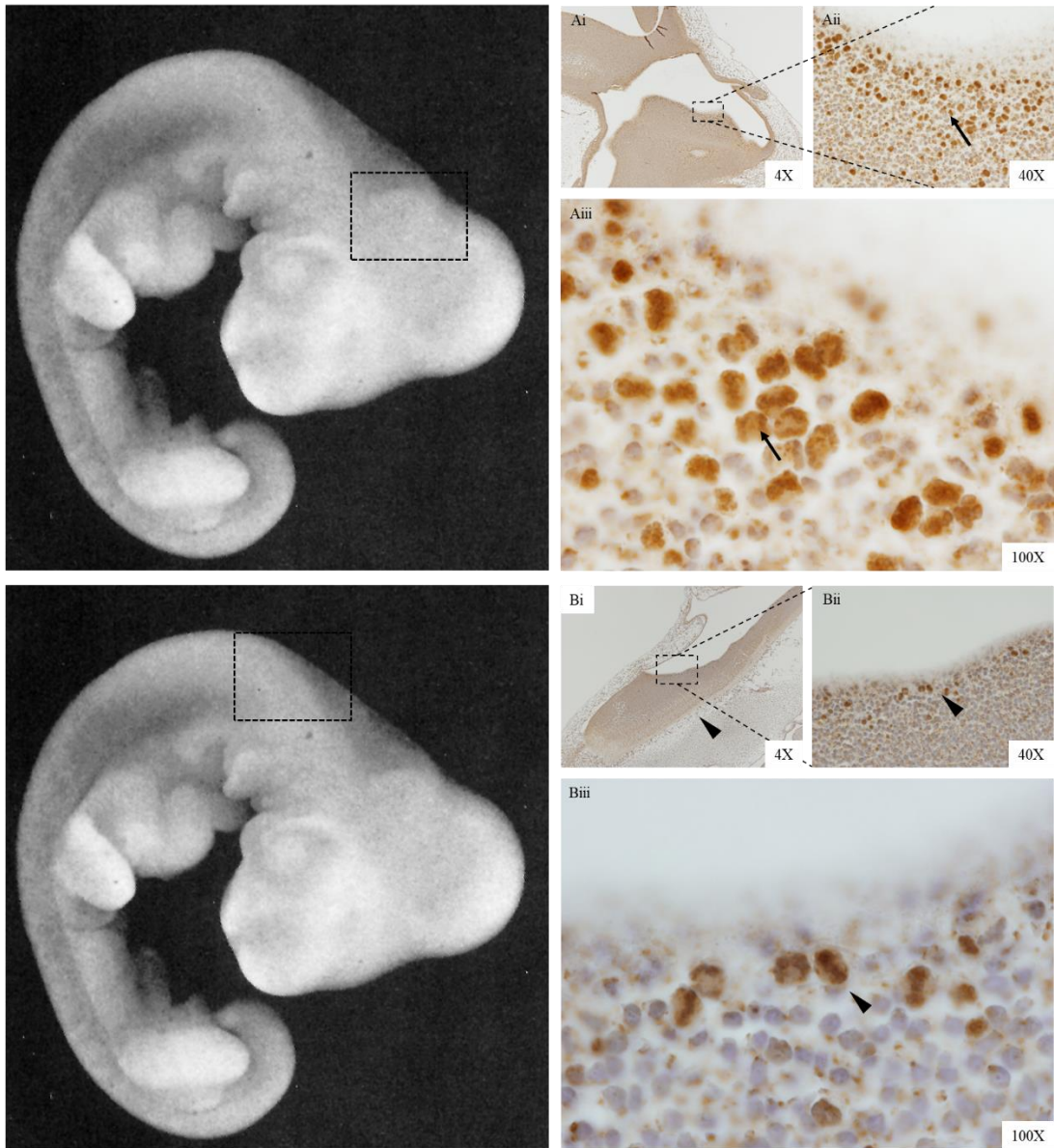


Figura 19 - Otimização da detecção da expressão de Hairy 1 (H1) por imunohistoquímica em embrião de galinha. (Ai-iii, cérebro; Bi-iii, tubo neural) Cortes sagitais de um embrião HH24 marcado com anticorpo primário policlonal Anti-H1 (anticorpo policlonal #7645) (1/500). O retângulo na imagem de embrião inteiro (adaptada de 58) representa a região analisada. Seta, cérebro; cabeça de seta, tubo neural.

3.2.2. Expressão de Hairy1 ao longo do desenvolvimento do tecido neural

Relativamente à expressão de H1 no embrião de galinha de estágio HH11 (Figura 20, Ai-iii), verificou-se que este é expresso nos sómitos (Figura 20, Aiii, seta a tracejado) e na notocorda (Figura 20, Aiii, asterisco). Em embriões de galinha em estágio HH13

(Figura 20, Bi-iii), é possível detetar expressão da proteína H1 na notocorda (asterisco), no tubo neural (Figura 20, Biii; cabeça de seta), bem como nos sómitos (Figura 20). No estadio HH15, H1 está presente nos sómitos, sendo observado no esclerótomo, miótomo e dermatomo (Figura 20, Ci-iii). Paralelamente, foi utilizado um conjunto de cortes em estadio HH19 sem anticorpo primário de forma a obter o controlo negativo desta experiência (Figura 20, Di-iii).

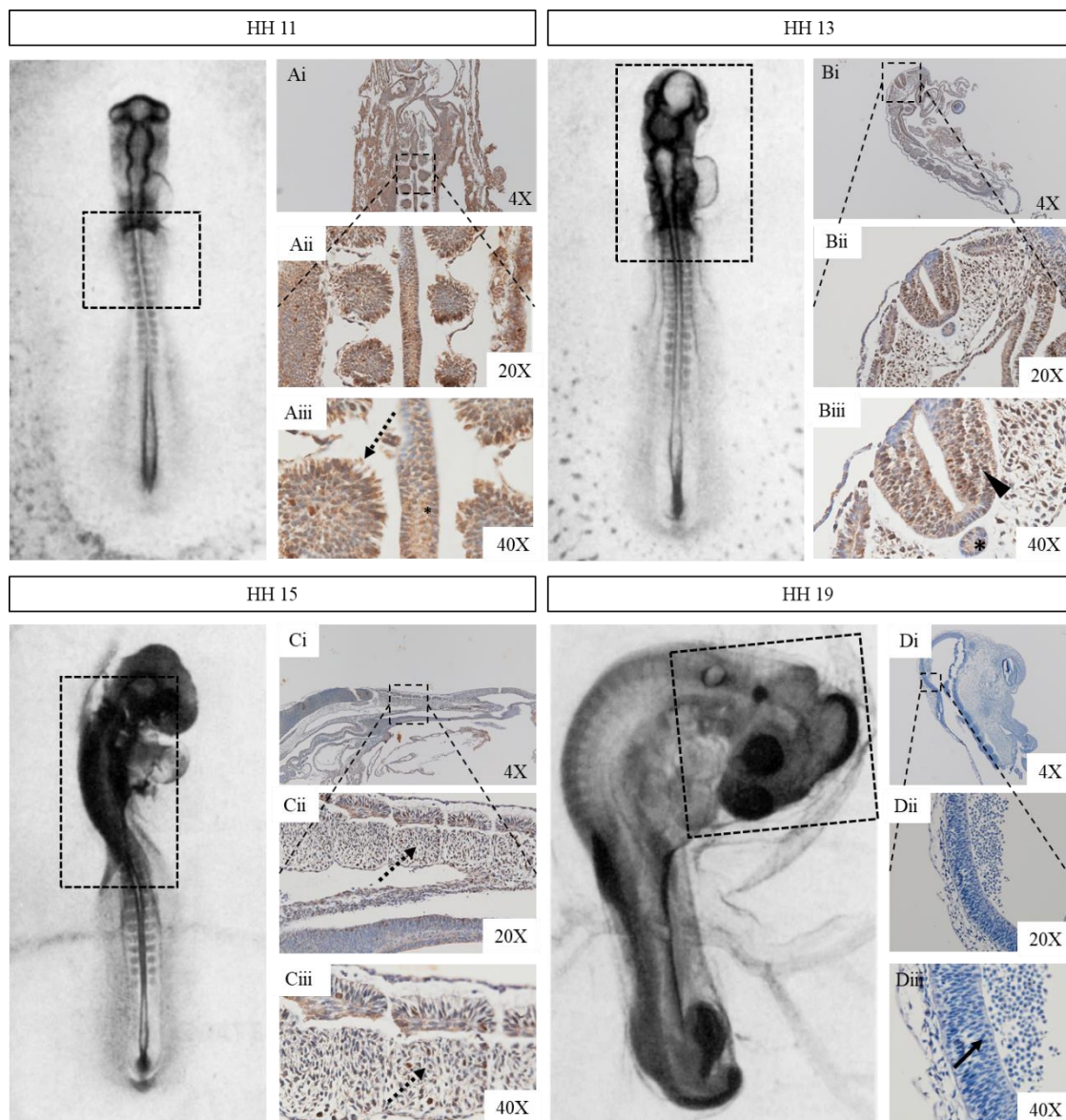


Figura 20 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH11 a HH19. Imagens representativas da deteção de H1 em cortes de embriões de galinha em HH11 (Ai-Aiii; frontal), HH13 (Bi-Biii; transversal), HH15 (Ci-Ciii; sagital) e HH19 (Di-Diii, sagital). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Asterisco, notocorda; cabeça de seta, tubo neural; seta tracejado, sómito; seta, cérebro.

Em embriões de galinha em estadio HH17 existe expressão de H1 em algumas células do tubo neural (cabeça de seta) e também nos tecidos adjacentes, como nos sómitos e na ectoderme (Figura 21, Ai-iii). Em embriões de galinha em estadio HH19, H1 expressa-se em algumas células do cérebro (Figura 21, Bi-iii, seta). Relativamente aos cortes dos embriões que se encontravam em estadio HH21, é possível observar que a expressão de H1 segue o mesmo padrão observado em embriões em HH19 (Figura 21, Ci-iii). Em estadio HH23, é possível observar expressão de H1 em algumas células de cérebro, no entanto, em menos quantidade (Figura 21, Di-iii, seta).

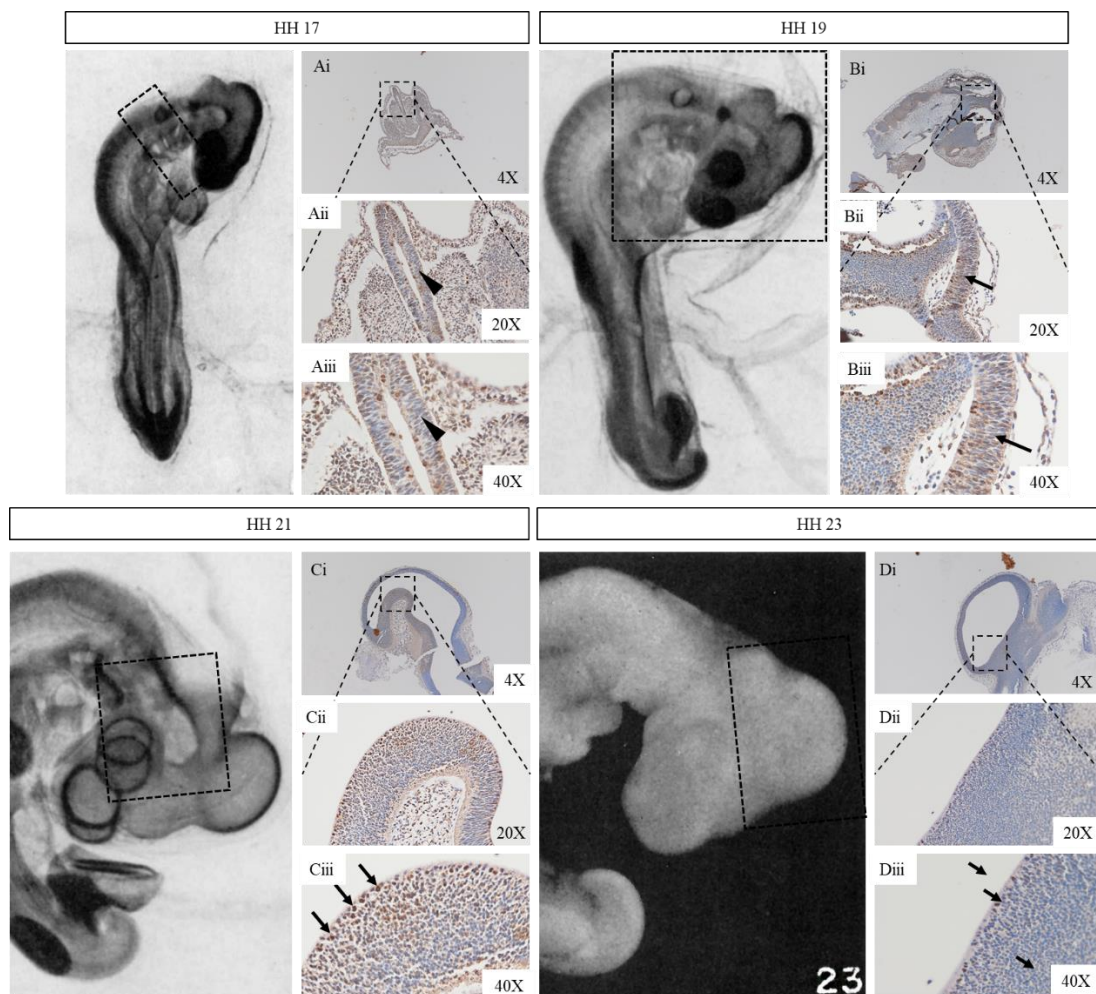


Figura 21 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH17 a HH23. Imagens representativas da detecção de H1 em cortes de embriões de galinha em HH17 (Ai-Aiii; transversal), HH19 (Bi-Biii; sagital), HH21 (Ci-Ciii; sagital) e HH23 (Di-Diii, sagital). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Cabeça de seta, tubo neural; seta, cérebro.

Relativamente aos embriões de galinha em estadio HH25, não se detetou qualquer expressão de H1 nos tecidos neurais, no entanto, observou-se a presença de precipitado de DAB (Figura 22, Ai-iii). Embriões de galinha em estadio HH27 mostram que H1 está presente em algumas células do tecido cerebral, no entanto, em menor quantidade quando comparado com estadios mais precoces, nomeadamente, HH11-HH21 (Figura 22, Bi-iii). O mesmo se pode observar em embriões de galinha no estadio HH29, quer a nível cerebral (Figura 22, Ci-iii, seta) ou do tubo neural (Figura 22, Di-iii, cabeça de seta).

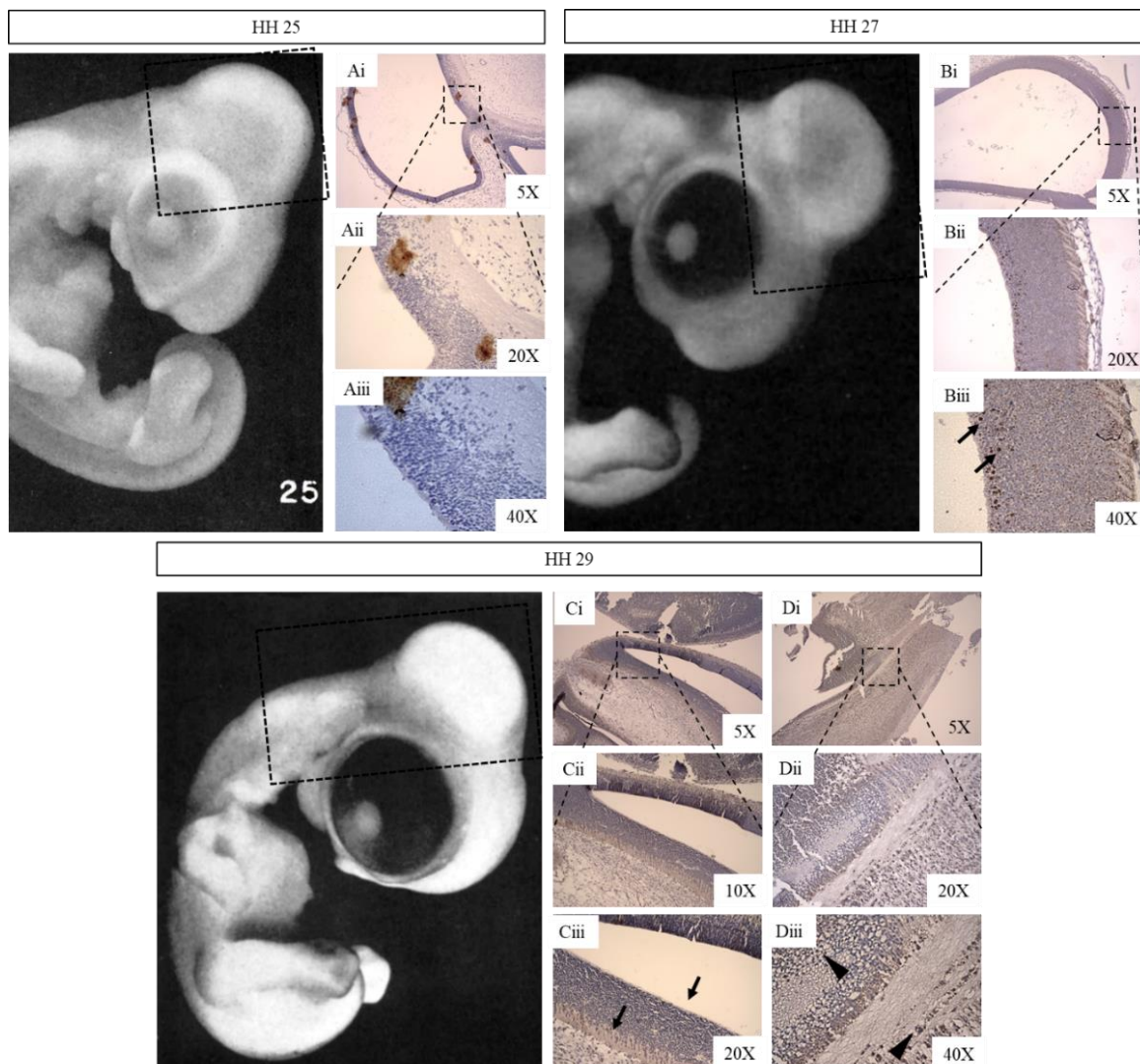


Figura 22 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH25 a HH29. Imagens representativas da deteção de H1 em cortes de embriões de galinha em HH25 (Ai-Aiii; sagital), HH27 (Bi-Biii; sagital), HH29 (Ci-Ciii, sagital, cérebro) (Di-Diii, sagital, tubo neural). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Cabeça de seta, tubo neural; seta, cérebro.

A partir do estadio HH31 até HH37, não se detetou a expressão de H1 nos tecidos cerebrais dos embriões de galinha (Figura 23).

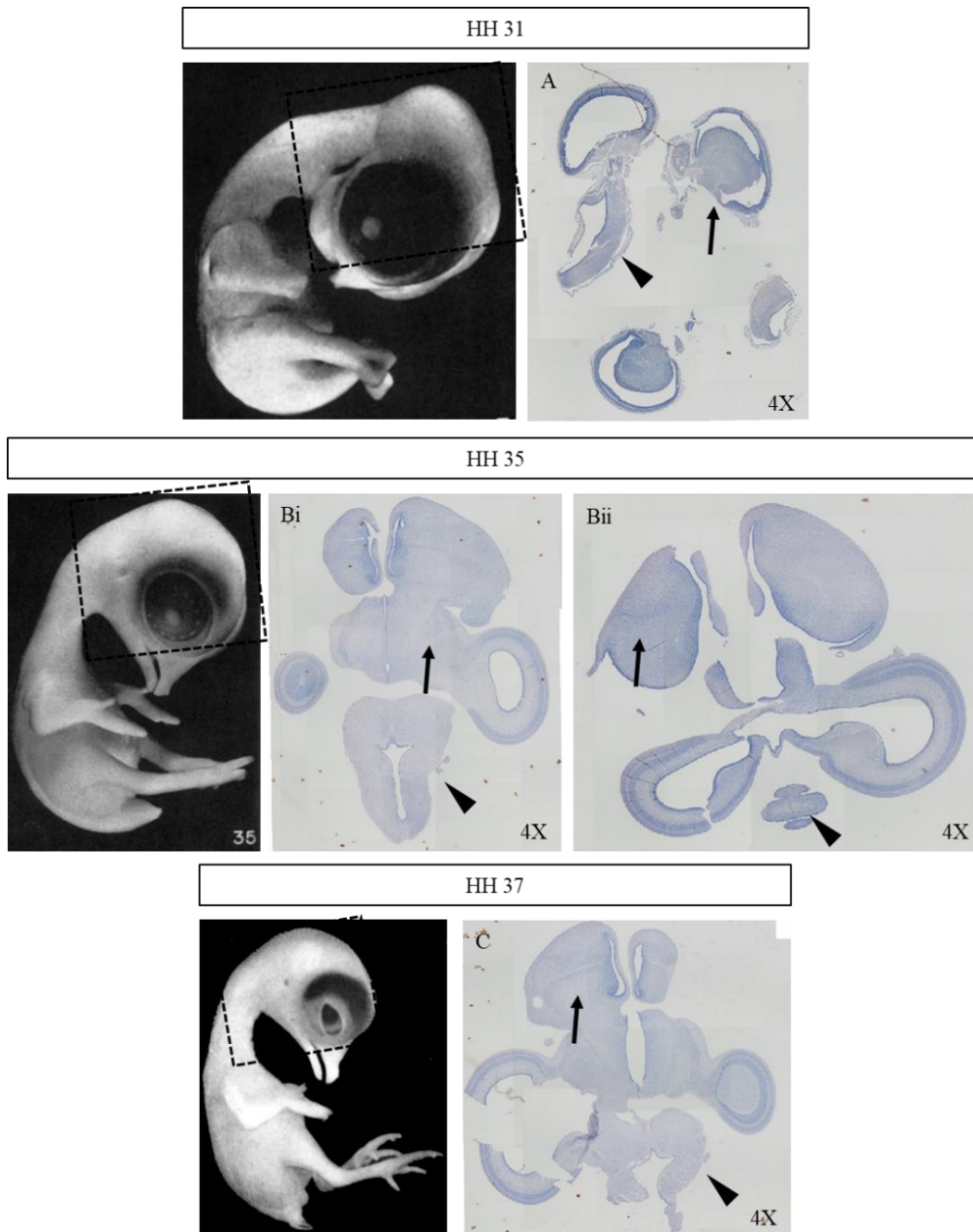


Figura 23 - Caracterização por imunohistoquímica da expressão de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha entre HH31 a HH37. Imagens representativas da detecção de H1 em cortes de embriões de galinha em HH31 (A; sagital), HH35 (Bi-Bii; transversal) e HH37 (C; transversal). Os retângulos nas imagens de embrião inteiro (adaptadas de 58) representam as regiões analisadas. Cabeça de seta, tubo neural; seta, cérebro.

Os resultados obtidos para a expressão de H1, nomeadamente a sua presença nos sómitos está de acordo com a literatura e com o seu papel no processo de somitogénese (82). Além disso, sabe-se que Hairy1/Hes1 tem um papel funcional no desenvolvimento e destino celular de células estaminais embrionárias e células progenitoras neurais (90). Em ratinho, a oscilação de Hes1 é determinante para a manutenção dos progenitores neurais pela ativação da via de sinalização Notch (91). De acordo com os nossos resultados em embrião de galinha, H1 é nitidamente expresso em células neurais que se encontram em divisão mitótica (Figuras 18, 19) sugerindo um papel funcional nos processos de mitose de células neurais. De facto, H1 é cada vez menos expresso de uma forma geral ao longo dos estadios HH11-27, deixando mesmo de ser detetável a partir de HH31, sugerindo que esta proteína possa ter um papel funcional apenas em fases iniciais do desenvolvimento. Por isso, seria interessante repetir estes ensaios de imunohistoquímica de maneira a caracterizar o padrão de expressão de H1 ao longo do desenvolvimento no embrião de galinha, isto é, num intervalo de tempo mais amplo incluindo os estadios HH1-10 e HH37-46. Na Tabela 7, encontram-se representadas estruturas, em diferentes estadios, que apresentavam diferentes níveis de expressão de H1.

Tabela 7 - Resumo do padrão de expressão de Hairy1 ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37. As estruturas analisadas foram notocorda, sómitos, tubo neural e cérebro. Branco, se, expressão de T (sem marcação). Cinzento, embriões/estruturas não observados/não dissecados (sem dados). Azul, expressão de Hairy1 (H1); o gradiente de cor reflete os níveis de expressão sendo que quanto mais claro, menos se expressa.

Hairy1	HH11	HH13	HH14	HH15	HH17	HH19	HH21	HH23	HH25	HH27	HH29	HH35	HH37
Notocorda	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Sómitos	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tubo neural	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cérebro	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

H1
 Sem marcação
 Sem dados

Com base nos nossos resultados, é possível fazer uma comparação da expressão de Brachyury (T) com Hairy1 (H1) ao longo do desenvolvimento em embrião de galinha. Observou-se que T e H1 encontram-se expressos na notocorda em HH11-13 (Figuras 12, 20), no tubo neural nos estadios HH17 (Figuras 13, 21) e no cérebro em HH19-21 (Figuras 13, 21), HH23 (Figuras 14, 21) e HH29 (Figuras 14, 22). Na tabela 8, encontram-se

representadas estruturas, em diferentes estadios, que apresentavam diferentes níveis de expressão de T e H1.

Tabela 8 – Comparação dos padrões de expressão de Brachyury e Hairy1 ao longo do desenvolvimento embrionário do embrião de galinha em HH11-37. As estruturas analisadas foram notocorda, sómitos, tubo neural e cérebro. Verde, expressão de T e H1. O gradiente de cor reflete os níveis de expressão sendo que quanto mais claro, menos se expressa.

T e H1	HH11	HH13	HH14	HH15	HH17	HH19	HH21	HH23	HH25	HH27	HH29	HH35	HH37
Notocorda	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza
Sómitos	Verde	Azul	cinza	Azul	Azul	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza
Tubo neural	cinza	Azul	cinza	Amarelo	Verde	cinza	cinza	cinza	cinza	cinza	Azul	Amarelo	Amarelo
Cérebro	cinza	cinza	cinza	Amarelo	cinza	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Azul	Verde	Amarelo	Amarelo

T
 H1
 Ambos T e H1
 Sem dados

Estes dados levantam questões relativamente ao seu significado funcional no desenvolvimento neural pelo que estes ensaios deveriam ser confirmados. De facto, o nosso grupo de investigação também possui dados de IHC e hibridação *in situ*, que demonstram que T e H1 co-localizam durante a gastrulação de embrião de galinha. Além destes, seria interessante realizar ensaios de dupla imunofluorescência de forma a caracterizar a co-localização de T e H1 em embrião de galinha ao longo do desenvolvimento.

O nosso laboratório detém dados que demonstram que H1 interage com T durante a gastrulação por *Bimolecular Fluorescent Complementation* (BIFC) e *Proximity Ligation Assay* (PLA) (dados não publicados). Por isso, iniciaram-se ensaios de dupla imunofluorescência para otimizar as condições experimentais, as quais não foram avante devido à pandemia (Figuras 29 e 30, Anexo). Assim, seria interessante realizar ensaios de dupla imunofluorescência para caracterizar o padrão de expressão de T e H1 nos mesmos tecidos.

3.3. Detecção e quantificação da proteína T nos estadios HH25, 29, 30 e 32

De forma a detetar e quantificar Brachyury (T) nos tecidos de embrião de galinha ao longo do seu desenvolvimento embrionário (HH25-32), utilizou-se a técnica de *western blot*.

Para determinar quais as condições mais adequadas, foram realizadas otimizações testando diferentes diluições do anticorpo primário anti-T, neste caso 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/5000, em extrato proteico de embrião de galinha em estadio HH14. Detetaram-se cinco isoformas proteicas diferentes de Brachyury (T) correspondentes a cinco pesos moleculares diferentes (Figura 24). Entre elas, a banda assinalada na imagem apresenta aproximadamente 47 kDa que corresponde ao tamanho descrito na literatura.

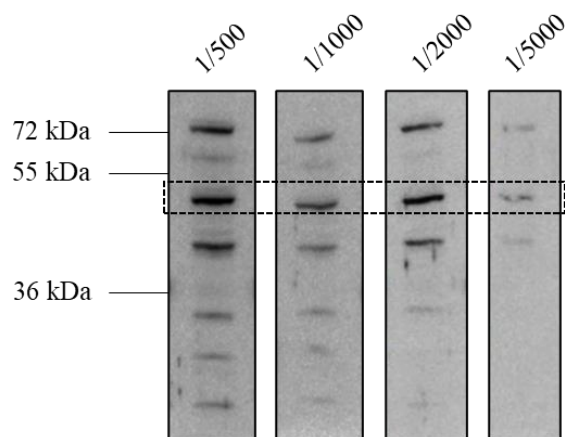


Figura 24 - Otimização da deteção da proteína de Brachyury (T) por análise de *western blot* em 10 µg de extrato proteico de embrião de galinha HH14. T com, aproximadamente, 47 kDa, retângulo tracejado.

Tendo em conta os resultados obtidos através das quatro condições analisadas para o anticorpo primário anti-T, escolheu-se a diluição 1/2000 para detetar a presença de T nos tecidos de embrião de galinha que permite identificar a proteína com o tamanho esperado.

Relativamente à presença de T em estadios de desenvolvimento mais avançados, observou-se a presença de mais do que uma isoforma proteica (Figura 25, A). A análise semiquantitativa (Figura 25, B) mostrou que as diferentes isoformas apresentam diferentes níveis de expressão. Assim, a isoforma proteica de T correspondente ao maior

peso molecular (banda número 1) apresenta maiores níveis de expressão do que as restantes em embriões HH25-32 (Figura 25, B, 1). Este padrão também se verifica para as isoformas 3, 4 e 5: a expressão é sempre superior em embriões mais tardios (HH30, HH32) vs. embriões mais precoces (HH25, HH29) (Figura 25, B, 3-5).

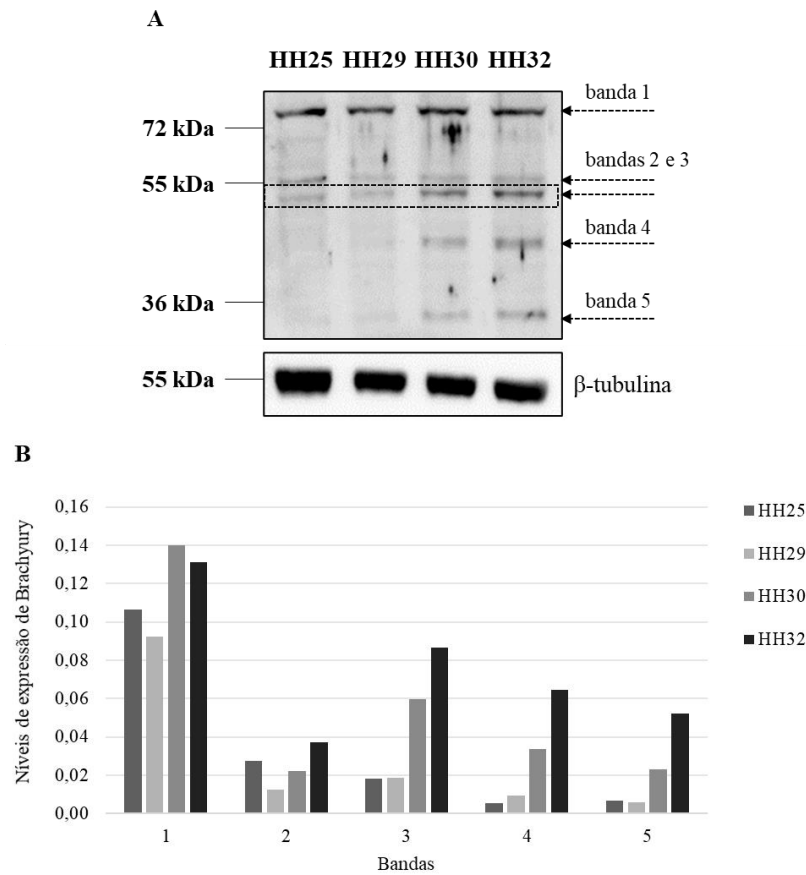


Figura 25 - Detecção por *western blot* de Brachyury em embriões de galinha entre HH25 e HH32. (A) (HH25, HH29, HH30, HH32) Brachyury corresponde a, aproximadamente, 47 kDa, retângulo tracejado (1/2000). Controlo de carga, β -tubulina, correspondente a 55 kDa (1/200000). (B) Análise semi-quantitativa dos níveis de expressão de Brachyury normalizado para os níveis de β -tubulina, em embrião de galinha HH25-32.

Os resultados de *western blot* revelaram que as diferentes isoformas de T estão mais expressas em estádios mais velhos (HH30-32). Seria interessante repetir esta experiência utilizando um número maior de réplicas experimentais com o objetivo de analisar a mesma amostra biológica mais do que uma vez. Seria também interessante realizar esta experiência em embriões de estádios mais novos de forma a detetar T e as suas isoformas proteicas num intervalo de tempo mais alargado do desenvolvimento embrionário da galinha e para apurar se estas são as mesmas que se encontram a ser expressas na mesoderme pré-somática em estádios mais novos.

A galinha apresenta apenas um transcrito para Brachyury, TBXT-201, o qual codifica para uma proteína de 433 aminoácidos (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000011489;r=3:43047577-43055477;t=ENSGALT00000018726) (95). Os nossos resultados sugerem que, para além desta isoforma proteica, existem mais quatro, cujo significado funcional é desconhecido. Por isso, seria interessante realizar ensaios que pudessem ajudar na identificação das isoformas detetadas. Tal como foi mencionado no início deste trabalho, T tem a capacidade de interagir com outras proteínas a fim de desempenhar o seu papel funcional no desenvolvimento neural, nomeadamente com H1 durante a gastrulação. Por isso, seria importante realizar mais ensaios de *western blot* em cérebros dissecados a fim de analisar a existência destas e/ou de novas isoformas em estadios mais novos (HH1-24) e mais velhos (HH33-46).

3.4. Detecção e quantificação da proteína H1 em embriões de galinha de estadio HH25, 29, 30 e 32

De forma a detetar e quantificar Hairy 1 (H1) nos tecidos de embrião de galinha ao longo do seu desenvolvimento embrionário (HH25-32), utilizou-se novamente a técnica de *western blot*.

Para apurar quais as condições mais adequadas para detetar a presença de H1, realizaram-se várias otimizações de forma a testar o anticorpo primário policlonal anti-H1, na forma de soro e na sua forma purificada (doravante designadas #7645_S e #7645_P, respetivamente). Numa fase inicial, foram testadas diferentes diluições apenas para #7645_P, sendo estas 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/5000 (Figura 23). Após a sua análise, detetou-se a presença de pelo menos duas isoformas da proteína H1 correspondente a dois pesos moleculares, em todas as condições (Figura 26). A banda assinalada na imagem apresenta aproximadamente 37 kDa que corresponde ao tamanho descrito na literatura.

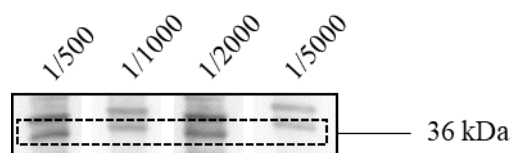


Figura 26 - Otimização da detecção da proteína Hairy 1 (H1) por análise de *western blot* em embrião de galinha HH14. H1 corresponde a, aproximadamente, 37 kDa, retângulo tracejado (#7645_P em BSA 5%).

Seguidamente, procedeu-se a mais uma otimização apenas com as condições 1/1000 e 1/2000 de #7645_S e #7645_P em extrato proteico de embrião de galinha em estadio HH14 (Figura 27). Observou-se que a condição mais indicada para #7645_S é com um fator de diluição de 1/1000, uma vez que para a diluição 1/2000 a banda é muito tênue (Figura 27, A). Para #7645_P a diluição mais adequada é 1/2000, uma vez que se deteta a proteína de interesse e apresenta bandas inespecíficas mais ténues (Figura 27, C). Simultaneamente, utilizou-se proteína H1 purificada podendo assim confirmar o peso molecular de H1 (37 KDa) (Figura 27, B).

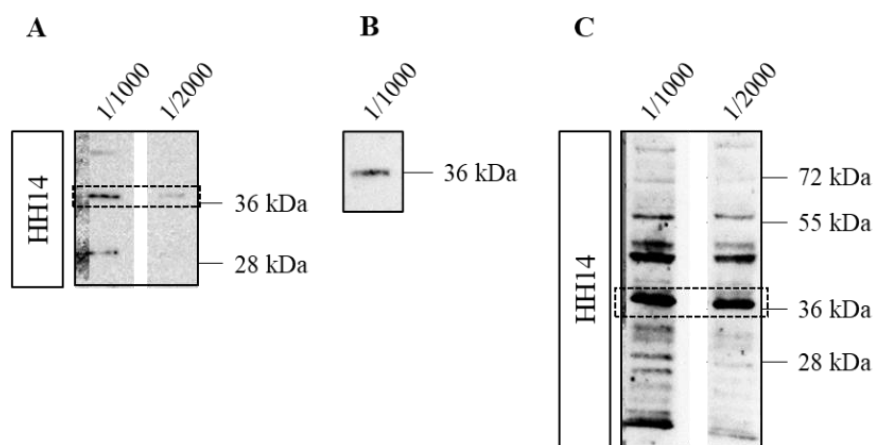


Figura 27 - Otimização da detecção da proteína Hairy 1 (H1) por análise de *western blot* em embrião de galinha HH14. (A) Diferentes diluições do anticorpo primário em forma de soro (#7645_S em leite 1%). (B) Controlo positivo, proteína Hairy 1 pura. (C) Diferentes diluições do anticorpo primário na sua forma purificada (#7645_P em leite 1%). H1 corresponde a, aproximadamente, 37 kDa, retângulo tracejado.

Tendo em conta os resultados obtidos através das otimizações, selecionou-se o anticorpo primário anti-H1 purificado (#7645_P) diluído a 1/2000 para detetar a presença de H1 ao longo do desenvolvimento embrionário de galinha. O anticorpo #7645_S

apresenta menos bandas específicas, no entanto o sinal obtido é muito mais fraco pelo que seria necessário diminuir bastante o fator de diluição para conseguir obter um sinal mensurável.

Em embriões HH25-HH32, verificaram-se quatro isoformas proteicas diferentes de Hairy1 (H1) correspondentes às bandas com os números 1, 2, 3 e 4 (Figura 28, A). Ao longo do desenvolvimento embrionário da galinha (HH25-32), a isoforma 1 não apresentou níveis de expressão significativamente diferentes, ocorrendo o mesmo com as restantes isoformas proteicas detetadas (Figura 28, B, 2-4). No que diz respeito à isoforma que corresponde à banda 2, verificou-se que em HH32, o nível de expressão de H1 apresentou um aumento significativo comparativamente às restantes isoformas proteicas (Figura 28, B) corroborando o que se observa visualmente (Figura 28, A). A banda 3 foi aquela que mais se aproximou do tamanho esperado de, aproximadamente, 37 kDa para H1 (Figura 28, A, 3). Quanto aos seus níveis de expressão, observou-se que estes não apresentam níveis de expressão significativamente diferentes (Figura 28, B, 3). A isoforma de H1 representada pela banda número 4, não foi detetável em HH25 (Figura 28, A e B, respetivamente).

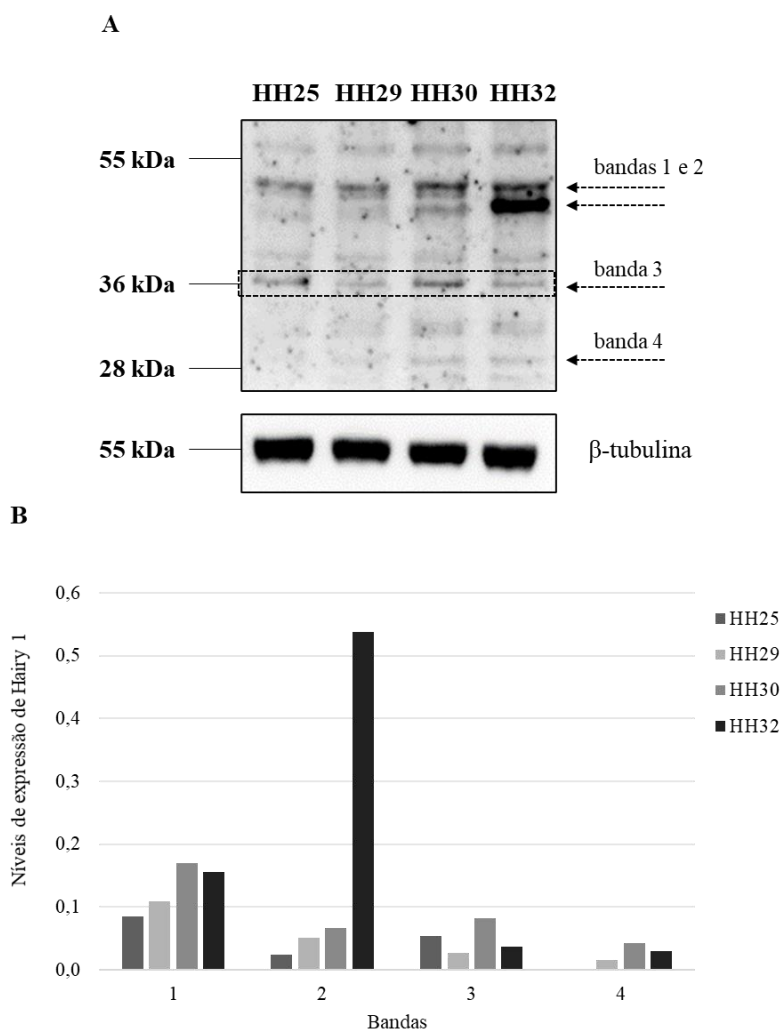


Figura 28 - Detecção por *western blot* de Hairy 1 (H1) em embriões de galinha HH25-32. (HH25, HH29, HH30, HH32) Hairy 1 corresponde a, aproximadamente, 37 kDa, retângulo tracejado. Controlo de carga, β -tubulina, correspondente a 55 kDa. (B) Análise semi-quantitativa dos níveis de expressão de H1, normalizado para os níveis de β -tubulina, em embrião de galinha HH25-32.

Após a observação destes resultados, surgiram questões relacionadas com a origem específica das bandas detetadas. Durante a sua análise, questionou-se se estas poderiam representar outras proteínas da família Hes. Apesar do carácter desnaturante da técnica SDS-PAGE, o SDS pode não ter desnaturado todas as proteínas presentes nas amostras resultando nas diferentes bandas detetadas por *western blot*. Portanto, as diferentes bandas também poderão corresponder a complexos proteicos resultantes da interação de Hairy1 (H1) com outras proteínas.

Além disso e à semelhança dos ensaios realizados para T, seria interessante repetir esta experiência utilizando também um número maior de réplicas experimentais com o

objetivo de analisar a mesma amostra biológica mais do que uma vez. Seria também interessante realizar este ensaio em embriões de estadios mais novos de forma a detetar H1 e as suas isoformas proteicas num intervalo maior de tempo do desenvolvimento embrionário da galinha e para apurar se estas são as mesmas que se encontram a ser expressas na mesoderme pré-somática em estadios mais novos.

A dinâmica de expressão de Hes1 desempenha um papel crucial no desenvolvimento e destino celular de células estaminais embrionárias e células progenitoras neurais (90). Assim sendo, seria importante repetir estes ensaios em cérebros isolados para estudar a presença e níveis de expressão de Hairy1 e suas isoformas em tecidos neurais.

Os nossos resultados demonstram a existência de 3 isoformas de Hairy1 no embrião de galinha pelo que se levantam questões sobre o seu significado e papel funcional nos estadios analisados. De facto, H1 tem a capacidade para homo ou heterodimerizar (84). Portanto, este pode ser um dos significados para a deteção de mais isoformas proteicas. A banda 2 tem um aumento significativo de expressão em HH32, levantando questões sobre qual o significado desta isoforma e quais as estruturas ou as células novas que esta isoforma de H1 está a desempenhar a sua função. Por isso, seria importante realizar mais ensaios para compreender o seu significado.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Para estudar a o papel de T na diferenciação dos tecidos de neuroectoderme, foi feita a caracterização do padrão de expressão de T em tecidos neurais de embrião de galinha ao longo do seu desenvolvimento (HH11-37). A otimização das condições adequadas para a utilização do anticorpo primário anti-T e a caracterização do padrão de expressão de T através de imunohistoquímica foram possíveis concluir com sucesso. Dados obtidos pelo nosso laboratório indicam que H1 poderá constituir um interator proteico de T. Portanto, foi também realizada a caracterização do padrão de expressão de H1 no mesmo intervalo de estadiamento do desenvolvimento embrionário da galinha (HH11-37). A otimização das condições adequadas para a utilização do anticorpo primário anti-H1 e a caracterização do seu padrão de expressão através de imunohistoquímica foram possíveis terminar com sucesso. Os resultados obtidos através destes ensaios poderão ajudar a compreender futuramente o porquê das diferentes funções de T em distintas linhagens celulares.

Para comparar os padrões de expressão de T e de H1 no mesmo tecido, os ensaios de imunohistoquímica foram realizados em cortes seriados. Viu-se que T e H1 encontram-se expressos na notocorda em HH11 e HH13, no tubo neural nos estadios HH17 e no cérebro em HH19, HH21, HH23 e HH29. Para além deste estudo, será interessante realizar mais ensaios no futuro, como por exemplo, dupla imunofluorescência e hibridação in situ, os quais poderão fornecer dados sobre a co-localização de T e de H1 no mesmo tecido ao realizar esta técnica na mesma amostra biológica. Estes ensaios tiveram início durante o presente trabalho, mas não foi possível otimizar as condições experimentais por limitações de tempo. Em anexo constam os resultados preliminares destes ensaios, nomeadamente, a produção de sonda T e a deteção de mRNA de T em embriões inteiros HH11-13. Contudo, é necessário repetir os ensaios para otimizar as condições experimentais.

Para detetar isoformas específicas ou complexos proteicos de T e H1, foi extraída com sucesso a proteína total de embriões HH25-32 tendo sido quantificados com sucesso por *western blot*. Para a obtenção destes dados, foram otimizadas as condições ótimas para a utilização dos anticorpos primários pertencentes ao nosso laboratório. Futuramente, é importante realizar estes ensaios em tecidos neurais dissecados de forma

a detetar e quantificar isoformas específicas ou complexos proteicos de T e H1 em tecidos derivados da linhagem celular neuroectoderme.

Estudar a presença de diferentes isoformas proteicas ou de complexos proteicos de Brachyury originados pela sua interação com outras proteínas, como por exemplo Hairy1, em tecidos embrionários pode fornecer novos dados sobre a função de T no contexto da biologia do desenvolvimento. Com estes dados, será possível deslindar os mecanismos moleculares por detrás das diferentes funções de Brachyury nas distintas linhagens celulares.

Compreender o motivo pelo qual Brachyury desempenha papéis distintos na biologia do desenvolvimento poderá auxiliar na compreensão dos processos tumorigénico em está implicado.

5. Referências Bibliográficas

1. **Gilbert, S.F.** (2017). "Developmental biology, the stem cell of biological disciplines." *PLoS Biol* Vol. **15** (12): e2003691. doi: 10.1371/journal.pbio.2003691
2. **Aiello, N.M., Stanger, B.Z.** (2016). "Echoes of the embryo: Using the developmental biology toolkit to study cancer." *Disease Models and Mechanisms* Vol. **9** (2): 105-114. doi: 10.1242/dmm.023184
3. **Gilbert, S.F., Barresi M.J.F.** (2016). *Developmental Biology*. (11ª edição). *Am J Med Genet Part A*. Vol. **173** (5): 1430-1430
4. **Gilbert, S.F.** (2014). *Developmental Biology*. (10ª edição). Sinauer Associates: Sunderland, MA.
5. **Sanz-Ezquerro, J.J., Münsterberg, A.E., Stricker, S.** (2017). "Editorial: Signaling Pathways in Embryonic Development." *Front Cell Dev Biol* Vol. **5**: 76. doi: 10.3389/fcell.2017.00076
6. **Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2011). "Hallmarks of cancer: The next generation." *Cell* Vol. **144** (5): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
7. **Giles, R.H., Van Es, J.H., Clevers, H.** (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* Vol. **1653** (1): 1-24. doi: 10.1016/s0304-419x(03)00005-2
8. **Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R.** (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol. **15**: 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
9. **Pardal, R., Clarke, M.F., Morrison, S.J.** (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nature Reviews Cancer* Vol. **3** (12): 895-902. doi: 10.1038/nrc1232
10. **Gzil, A., Zarębska, I., Bursiewicz, W., Antosik, P., Grzanka, D., Szyłberg, Ł.** (2019). "Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications." *Molecular Biology Reports* Vol. **46** (6): 6629-6645. doi: 10.1007/s11033-019-05058-1
11. **Al-hajj, M., Wicha, M.S., Benito-hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F.** (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *PNAS* Vol. **100** (7): 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
12. **Cabrera, M.C., Hollingsworth, R.E., Hurt, E.M.** (2015). "Cancer stem cell

- plasticity and tumor hierarchy." *World J Stem Cells* Vol. **7** (1): 27-36. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.27
13. **Manzo, G.** (2019). "Similarities Between Embryo Development and Cancer Process Suggest New Strategies for Research and Therapy of Tumors: A New Point of View." *Front. Cell Dev. Biol.* Vol. **7**: 20. doi: 10.3389/fcell.2019.00020
 14. **Battle, E., Clevers, H.** (2017) "Cancer stem cells revisited." *Nature Medicine* Vol. **23**: 1124-1134. doi: 10.1038/nm.4409
 15. **Papaccio, F., Paino, F., Regad, T., Papaccio, G., Desiderio, V., Tirino, V.** (2017). "Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development." *Stem Cells Translational Medicine* Vol. **6** (12): 2115-2125. doi: 10.1002/sctm.17-0138
 16. **Phi, L.T.H., Sari, I.N., Yang, Y.G., Lee, S.H., Jun, N., Kim, K.S., et al.** (2018). "Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment." *Stem Cells International* Vol. **2018**: 5416923. doi: 10.1155/2018/5416923
 17. **Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2011) "Hallmarks of cancer: The next generation." *Cell* Vol. **144** (5): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
 18. **Fernandes, M.T., Calado, S.M., Mendes-Silva, L., Bragança, J.** (2020). "CITED2 and the modulation of the hypoxic response in cancer." *World J Clin Oncol.* Vol. **11** (5): 260-274. doi: 10.5306/wjco.v11.i5.260
 19. **Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al.** (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer.* Vol. **136** (5): E359–86. doi: 10.1002/ijc.29210
 20. **Weinberg, R.A.** (2014). *The Biology of Cancer.* (2ª edição). Garland Science.
 21. **Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P.** (2011). *Anatomia e Fisiologia.* (8ª Edição). Lusociência.
 22. **Strachan, T., Read, A.** (2010). *Human Molecular Genetics.* (4ª edição). Gene Expression. Garland Science, p. 786.
 23. **Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W.** (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* Vol. **339** (6127): 1546-1558. doi: 10.1126/science.1235122.
 24. **Strachan, T., Goodship, J., Chinnery, P.** (2015). "Genetics and Genomics in Medicine." (2ª edição). Garland Science p. 526.

25. **Mendelsohn, J., Gray, J.W., Howley, P.M., Israel, M.A., Thompson, C.B.** (2015). "*The Molecular Basis of Cancer.*" (4ª edição). Elsevier Saunders.
26. **Li, S., Balmain, A., Counter, C.M.** (2018). "A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot." *Nat Rev Cancer* Vol. 18 (12): 767-777. doi: 10.1038/s41568-018-0076-6
27. **Burkhart, D.L., Morel, K.L., Sheahan, A.V., Richards, Z.A., Ellis, L.** (2019). "The Role of RB in Prostate Cancer Progression." *Adv Exp Med Biol.* Vol. 1210: 301-318. doi: 10.1007/978-3-030-32656-2_13
28. **Wirtz, D., Konstantopoulos, K., Searson, P.C.** (2011). "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis." *Nature Reviews Cancer* Vol. 11: 512-522. doi: 10.1038/nrc3080
29. **Fernando, R.I., Litzinger, M., Trono, P., Hamilton, D.H., Schlom, J., Palena, C.** (2010). "The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells." *J Clin Invest* Vol. 120 (2): 533-544. doi: 10.1172/JCI38379
30. **Roselli, M., Fernando, R.I., Guadagni, F., Spila, A., Alessandroni, J., Palmirota, R., et al.** (2012). "Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition, is overexpressed in human lung tumors: an opportunity for novel interventions against lung cancer." *Clin Cancer Res* Vol. 18 (14): 3868-3879. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3211
31. **Miettinen, M., Wang, Z., Lasota, J., Heery, C., Schlom, J., Palena, C.** (2015). "Nuclear Brachyury Expression Is Consistent in Chordoma, Common in Germ Cell Tumors and Small Cell Carcinomas, and Rare in Other Carcinomas and Sarcomas: An Immunohistochemical Study of 5229 Cases." *Am J Surg Pathol* Vol. 39 (10): 1305-1312. doi: 10.1097/PAS.0000000000000462
32. **Pinto, F., Cárcano, F. M., da Silva, E., Vidal, D. O., Scapulatempo-Neto, C., Lopes, L. F., Reis, R. M.** (2018). "Brachyury oncogene is a prognostic factor in high-risk testicular germ cell tumors." *Andrology*, Vol. 6 (4): 597-604. doi: 10.1111/andr.12495
33. **Vujovic, S., Henderson, S., Presneau, N., Odell, E., Jacques, T.S., Tirabosco, R., et al.** (2006). "Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas." *J Pathol.* Vol. 209 (2): 157-165. doi: 10.1002/path.1969
34. **Barresi, V., Ieni, A., Branca, G., Tuccari, G.** (2014). "Brachyury: A Diagnostic

- Marker for the Differential Diagnosis of Chordoma and Hemangioblastoma versus Neoplastic Histological Mimickers." *Dis Markers* **2014**: 514753. doi: 10.1155/2014/514753
35. **Tirabosco, R., Mangham, D.C., Rosenberg, A.E., Vujovic, S., Bousdras, K., Pizzolitto, S., et al.** (2008). "Brachyury expression in extra-axial skeletal and soft tissue chordomas: A marker that distinguishes chordoma from mixed tumor/myoepithelioma/parachordoma in soft tissue." *Am J Surg Pathol* Vol. 32 (4): 572-580. doi: 10.1097/PAS.0b013e31815b693a
 36. **Haro, A., Yano, T., Kohno, M., Yoshida, T., Koga, T., Okamoto, T., Takenoyama, M., Maehara, Y.** (2013). "Expression of Brachyury gene is a significant prognostic factor for primary lung carcinoma." *Ann Surg Oncol*. Vol. **20** Suppl 3:S509-16. doi: 10.1245/s10434-013-2914-9
 37. **Pinto, F., Pértega-Gomes, N., Pereira, M.S., Vizcaíno, J.R., Monteiro, P., Henrique, R.M., et al.** (2014). "T-box transcription factor brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness." *Clin Cancer Res*. Vol. **20** (18): 4949-4961. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0421
 38. **Palena, C., Roselli, M., Litzinger, MT., Ferroni, P., Costarelli, L., Spila, A., et al.** (2014). "Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: Association with poor prognosis." *Journal of the National Cancer Institute* Vol. **106** (5): dju054. doi: 10.1093/jnci/dju054.
 39. **Heery, C.R., Singh, B.H., Rauckhorst, M., Martí, J.L., Donahue, R.N., Grenga, I., Rodell, T.C., Dahut, W., Arlen, P.M., Madan, R.A., Schlom, J., Gulley, J.L.** (2015). "Phase I Trial of a Yeast-Based Therapeutic Cancer Vaccine (GI-6301) Targeting the Transcription Factor Brachyury." *Cancer Immunol Res*. Vol. **3** (11): 1248-1256. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0119
 40. **Madan, R.A., Bilusic, M., Heery, C., Schlom, J., Gulley, J.L.** (2012). "Clinical Evaluation of TRICOM Vector Therapeutic Cancer Vaccines." *Semin Oncol*. Vol. **39** (3): 296. doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.02.010
 41. **Hamilton, D.H., David, J.M., Dominguez, C., Palena, C.** (2017). "Development of cancer vaccines targeting brachyury, a transcription factor associated with tumor Tumor Epithelial-Mesenchymal Transition." *Cells Tissues Organs* Vol. **203** (2): 128-138. doi: 10.1159/000446495
 42. **Pinto, F., Gomes, N.P., Vizcaíno, J.R., Andrade, R.P., Cárcano, F.M., Reis, R.M.** (2016). "Brachyury as a potential modulator of androgen receptor activity

- and a key player in therapy resistance in prostate cancer." *Oncotarget*. Vol. **7** (20): 28891–902. doi: 10.18632/oncotarget.8499
43. **Hamilton, D.H., Roselli, M., Ferroni, P., Costarelli, L., Cavaliere, F., Taffuri, M., et al.** (2016) "Brachyury, a vaccine target, is overexpressed in triple-negative breast cancer." *Endocr Relat Cancer*. Vol. **23** (10): 783-796. doi: 10.1530/ERC-16-0037
 44. **Pinto, F., Costa, Â.M., Santos, G.C., Matsushita, M.M., Costa, S., Silva, V.A.O., et al.** (2020). "The T-box transcription factor brachyury behaves as a tumor suppressor in gliomas." *J Pathol*. Vol. **251** (1): 87-89. doi: 10.1002/path.5419
 45. **Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W.** (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." *Acta Neuropathol*. Vol. **131** (6): 803-820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
 46. **Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., et al.** (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol*. Vol. **114** (2): 97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
 47. **Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E.** (2018). "Genetic Abnormalities, Clonal Evolution, and Cancer Stem Cells of Brain Tumors." *Med Sci*. Vol. **6** (4): 85. doi: 10.3390/medsci6040085
 48. **Lenting, K., Verhaak, R., Ter Laan, M., Wesseling, P., Leenders, W.** (2017). "Glioma: experimental models and reality." *Acta Neuropathol*. Vol. **133** (2): 263-282. doi: 10.1007/s00401-017-1671-4
 49. **Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., et al.** (2015). "Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors." *N Engl J Med*. Vol. **372** (26): 2499-2508. doi: 10.1056/NEJMoa1407279
 50. **McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E.G., Brat, D.J., Mastrogiannis, G.M., et al.** (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* Vol. **455**: 1061–1068. doi: 10.1038/nature07385

51. **Cancer Genome Atlas Research Network, Brat, D.J., Verhaak, R.G., Aldape, K.D., Yung, W.K., Salama, S.R., et al.** (2015). "Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas." *N Engl J Med.* Vol. **372** (26): 2481-2498. doi: 10.1056/NEJMoa1402121
52. **Speidel, D.** (2015). "The role of DNA damage responses in p53 biology." *Arch Toxicol.* Vol. **89** (4): 501–17. doi: 10.1007/s00204-015-1459-z
53. **Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., et al.** (2010). "Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." *Cancer Cell* Vol. **17** (1): 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020
54. **Shah, S.R., David, J.M., Tippens, N.D., Mohyeldin, A., Martinez-Gutierrez, J.C., Ganaha, S., Schiapparelli, P., Hamilton, D.H., Palena, C., Levchenko, A., Quiñones-Hinojosa, A.** (2017). "Brachyury-YAP Regulatory Axis Drives Stemness and Growth in Cancer." *Cell Rep.* Vol. **21** (2): 495-507. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.057
55. **Showell, C., Binder, O., Conlon, F.L.** (2004). "T-box genes in early embryogenesis." *Dev Dyn.* Vol. **229** (1): 201-218. doi: 10.1002/dvdy.10480
56. **Chen, M., Wu, Y., Zhang, H., Li, S., Zhou, J., & Shen, J.** (2020). "The Roles of Embryonic Transcription Factor BRACHYURY in Tumorigenesis and Progression." *Frontiers in oncology*, Vol. **10**: 961. doi: 10.3389/fonc.2020.00961
57. **Chang, F., Xing, P., Song, F., Du, X., Wang, G., Chen, K., & Yang, J.** (2016). "The role of T-box genes in the tumorigenesis and progression of cancer (Review)." *Oncology Letters*, Vol. **12**: 4305-4311. doi: 10.3892/ol.2016.5296
58. **Papaiouannou, V.E.** (2014). "The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer." *Development* Vol. **141** (20): 3819-3833. doi: 10.1242/dev.104471
59. **Tian, C., Johnson, K.R.** (2020). "TBX1 is required for normal stria vascularis and semicircular canal development." *Dev Biol* Vol. **457** (1): 91–103. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.09.013
60. **Bush, J. O., Maltby, K. M., Cho, E. S., & Jiang, R.** (2003). "The T-box gene Tbx10 exhibits a uniquely restricted expression pattern during mouse embryogenesis." *Gene expression patterns : GEP*, Vol. **3** (4): 533–538. doi: 10.1016/s1567-133x(03)00060-7
61. **Singh, M. K., Petry, M., Haenig, B., Lescher, B., Leitges, M., & Kispert, A.**

- (2005). "The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development." *Mechanisms of development*, Vol. **122** (2): 131–144. doi: 10.1016/j.mod.2004.10.011
62. **Pauws, E., Hoshino, A., Bentley, L., Prajapati, S., Keller, C., Hammond, P., Martinez-Barbera, J. P., Moore, G. E., & Stanier, P.** (2009). "Tbx22null mice have a submucous cleft palate due to reduced palatal bone formation and also display ankyloglossia and choanal atresia phenotypes." *Human molecular genetics*, Vol. **18** (21): 4171–4179. doi: 10.1093/hmg/ddp368
63. **Bedogni, F., Hodge, R. D., Elsen, G. E., Nelson, B. R., Daza, R. A., Beyer, R. P., Bammler, T. K., Rubenstein, J. L., & Hevner, R. F.** (2010). "Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. **107** (29): 13129–13134. doi: 10.1073/pnas.1002285107
64. **Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F., Era, T., Nishikawa, S., Bikoff, E. K., Molnár, Z., Robertson, E. J., & Groszer, M.** (2008). "The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone." *Genes & development*, Vol. **22** (18): 2479–2484. doi: 10.1101/gad.475408
65. **Yoney, A., Bai, L., Brivanlou, A.H., Siggia, E.D.** (2021). "EOMES is responsible for WNT memory and can substitute for WNT in mesendoderm specification." *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.05.01.442278
66. **Douglas, N. C., Papaioannou, V. E.** (2013). "The T-box transcription factors TBX2 and TBX3 in mammary gland development and breast cancer." *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, Vol. **18** (2): 143–147. doi: 10.1007/s10911-013-9282-8
67. **Rowley, M., Grothey, E., & Couch, F. J.** (2004). "The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis." *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, Vol. **9** (2): 109–118. doi: 10.1023/B:JOMG.0000037156.64331.3f
68. **Kelberman, D., Dattani, M. T.** (2007). "Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology." *European journal of endocrinology*, Vol. **157** Suppl 1, S3–S14. doi: 10.1530/EJE-07-0156
69. **Zhang, Z., Huynh, T., Baldini, A.** (2006). "Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development." *Development (Cambridge, England)*, Vol. **133** (18): 3587–3595.

doi: 10.1242/dev.02539

70. **Arora, R., Metzger, R. J., Papaioannou, V. E.** (2012). "Multiple roles and interactions of Tbx4 and Tbx5 in development of the respiratory system." *PLoS genetics*, Vol. **8** (8): e1002866. doi: 10.1371/journal.pgen.1002866
71. **Dobrovolskaia-Zavadskaia, N.** (1927). "Regarding the spontaneous mortification of the tail of a new-born mouse and the existence of a hereditary characteristic (factor)." *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, Vol. **97**: 114-6.
72. **Willison, K.** (1990). "The mouse Brachyury gene and mesoderm formation." *Trends in genetics : TIG*, Vol. 6 (4): 104–105. doi: 10.1016/0168-9525(90)90106-g
73. **Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J., Herrmann, B. G.** (1995). "The chick Brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin." *Developmental biology*, Vol. 168 (2): 406-415. doi: 10.1006/dbio.1995.1090
74. **Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B., Weigel, D., Herrmann, B. G.** (1991). "Expression of a Xenopus homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction." *Cell*, Vol. 67(1): 79–87. doi: 10.1016/0092-8674(91)90573-h
75. **Pennimpe, T., Proske, J., König, A., Vidigal, J. A., Morkel, M., Bramsen, J. B., Herrmann, B. G., Wittler, L.** (2012). "In vivo knockdown of Brachyury results in skeletal defects and urorectal malformations resembling caudal regression syndrome." *Developmental biology*, Vol. **372** (1): 55–67. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.09.003
76. **Satoh, N., Tominaga, H., Kiyomoto, M., Hisata, K., Inoue, J., Nishitsuji, K.** (2021). "A Preliminary Single-Cell RNA-Seq Analysis of Embryonic Cells That Express Brachyury in the Amphioxus, Branchiostoma japonicum." *Front Cell Dev Biol*. doi: 10.3389/fcell.2021.696875
77. **Henrique, D., Abranches, E., Verrier, L., Storey, K. G.** (2015). "Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord." *Development (Cambridge, England)*, Vol. **142** (17): 2864-2875. doi: 10.1242/dev.119768
78. **Massaous, J., Hata, A.** (1997). "TGF-beta signalling through the Smad pathway." *Trends in cell biology*, Vol. **7** (5): 187–192. doi: 10.1016/S0962-8924(97)01036-2
79. **Faial, T., Bernardo, A. S., Mendjan, S., Diamanti, E., Ortmann, D., Gentsch,**

- G. E., Mascetti, V. L., Trotter, M. W., Smith, J. C., Pedersen, R. A.** (2015). "Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells." *Development (Cambridge, England)*, Vol. **142** (12), 2121-2135. doi: 10.1242/dev.117838
80. **Tosic, J., Kim, G.J., Pavlovic, M., Schröder, C.M., Mersiowsky, S.L., Barg, M., et al.** (2019). "Eomes and Brachyury control pluripotency exit and germ-layer segregation by changing the chromatin state." *Nat Cell Biol.* Vol. **21** (12): 1518-1531. doi: 10.1038/s41556-019-0423-1
81. **Gentsch, G. E., Owens, N. D., Martin, S. R., Piccinelli, P., Faial, T., Trotter, M. W., Gilchrist, M. J., Smith, J. C.** (2013). "In vivo T-box transcription factor profiling reveals joint regulation of embryonic neuromesodermal bipotency." *Cell reports*, Vol. **4** (6): 1185-1196. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.012
82. **Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Pourquié, O.** (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." *Cell*, Vol. **91** (5): 639-648. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80451-1
83. **Resende, T. P., Andrade, R. P., Palmeirim, I.** (2014). "Timing embryo segmentation: dynamics and regulatory mechanisms of the vertebrate segmentation clock." *BioMed research international*, 718683. doi: 10.1155/2014/718683
84. **Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T.** (2007). "The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis." *Development (Cambridge, England)*, Vol. **134** (7): 1243-1251. doi: 10.1242/dev.000786
85. **Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R.** (2008). "Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors." *Neuron*, Vol. **58** (1): 52-64. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.014
86. **Liu, Z. H., Dai, X. M., Du, B.** (2015). "Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance." *Cancer biology & therapy*, Vol. **16** (3): 353-359. doi: 10.1080/15384047.2015.1016662
87. **Sun, L., Ke, J., He, Z., Chen, Z., Huang, Q., Ai, W., Wang, G., Wei, Y., Zou, X., Zhang, S., Lan, P., Hong, C.** (2017). "HES1 Promotes Colorectal Cancer Cell Resistance To 5-Fu by Inducing Of EMT and ABC Transporter Proteins." *Journal of Cancer*, Vol. **8** (14): 2802-2808. doi: 10.7150/jca.19142

88. **Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., Chiba, T., Kageyama, R.** (2012). "The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation." *Development (Cambridge, England)*, Vol. 139 (6): 1071-1082. doi: 10.1242/dev.069070
89. **Tian, C., Tang, Y., Wang, T., Yu, Y., Wang, X., Wang, Y., Zhang, Y.** (2015). "HES1 is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia." *OncoTargets and therapy*, Vol. 8, 899-904. doi: 10.2147/OTT.S83511
90. **Tian, C., You, M. J., Yu, Y., Zhu, L., Zheng, G., Zhang, Y.** (2016). "MicroRNA-9 promotes proliferation of leukemia cells in adult CD34-positive acute myeloid leukemia with normal karyotype by downregulation of Hes1." *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, Vol. 37 (6): 7461-7471. doi: 10.1007/s13277-015-4581-x
91. **Hamburger, V., Hamilton, H. L.** (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." *Journal of morphology*, Vol. 88 (1): 49-92. PMID: 24539719
92. **World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.** (2020). Cancer Tomorrow, GLOBOCAN. Recuperado em 21 março 2021, de <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/>
93. **Ensembl.** (2021). Gene: TBXT ENSG00000164458. Recuperado em 20 julho 2021, de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000164458;r=6:166157656-166168700
94. **UniProt.** (2021). UniProtKB - O15178 (TBXT_HUMAN). Recuperado em 20 julho 2021, de <https://www.uniprot.org/uniprot/O15178-1>
95. **Ensembl.** (2021, Maio). Gene: Gene: TBXT ENSGALG00000011489. Recuperado em 23 julho 2021, de http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000011489;r=3:43047577-43055477;t=ENSGALT00000018726

6. Anexos

6.1. Protocolos de tratamento das lâminas para detecção proteica por Imunohistoquímica

Durante a realização dos ensaios de imunohistoquímica, os cortes histológicos foram sujeitos a vários reagentes por uma ordem específica para auxiliar na desparafinação (Tabela 9) e na coloração dos mesmos a fim de observar a expressão de T e H1 ao microscópio (Tabela 10).

Tabela 9 - Série ordenada de reagentes pelo qual as lâminas foram sujeitas e respectivos períodos no primeiro dia do procedimento experimental.

	Reagente	Tempo (minutos)
1	Xilol (Carlo Erba Reagents)	5:00
2	Xilol (Carlo Erba Reagents)	5:00
3	Etanol Absoluto (Carlo Erba Reagents)	2:00
4	Etanol 96%	2:00
5	Etanol 70%	2:00
6	Água Corrente	2:00

Tabela 10 - Série ordenada de reagentes pelo qual as lâminas foram sujeitas e respectivos períodos no último dia do procedimento experimental.

Passo	Reagente	Tempo (minutos)
1	Água corrente	02:00
2	Hematoxilina de Harris (Merck)	00:01
3	Água corrente	03:00
4	Água amoniaca 0,5% (Sigma Aldrich)	00:06
5	Água corrente	02:00
6	Etanol 96%	02:00
7	Etanol 96%	02:00
8	Etanol Absoluto (Carlo Erba Reagents)	02:00
9	Xilol (Carlo Erba Reagents)	01:00

6.2. Otimização de dupla-imunofluorescência para comparação da localização de T e de H1 em embriões de galinha ao longo do desenvolvimento

A fim de pesquisar a co-localização Brachyury e Hairy1 nos mesmos cortes histológicos ao longo do desenvolvimento do embrião de galinha, procedeu-se à realização de ensaios de dupla imunohistoquímica. Procederam-se aos ensaios com o objetivo de otimizar as condições experimentais, no entanto, não foram avante devido à pandemia. Não se observou marcação significativa de T ou H1 sendo necessário repetir os ensaios de otimização (Figura 29 e 30, respetivamente).

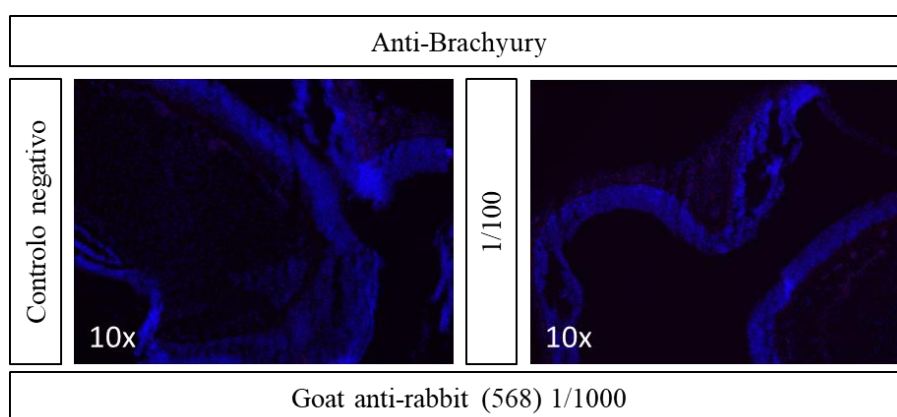


Figura 29 - Otimização da detecção da expressão de Brachyury (T) por imunofluorescência em embrião de galinha HH22. Corte de um embrião HH22 marcados com anticorpo primário Anti-T (1/100). Controlo negativo; corte de um embrião HH22 marcado na ausência de anticorpo primário. *Goat anti-rabbit* (568), anticorpo secundário (1/1000).

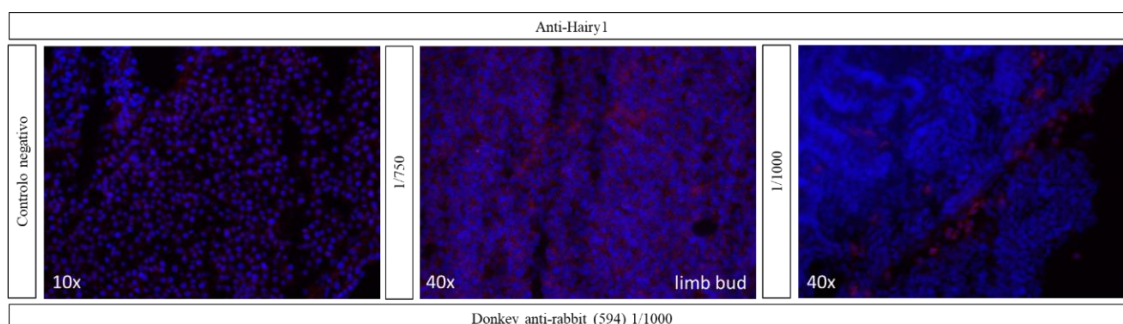


Figura 30 - Otimização da detecção da expressão de Hairy (H1) por imunofluorescência em embrião de galinha HH22. Corte de um embrião HH22 marcados com anticorpo primário Anti-H1 (1/750 e 1/100). Controlo negativo; corte de um embrião HH22 marcado na ausência de anticorpo primário. *Donkey anti-rabbit* (594), anticorpo secundário (1/1000).

6.3. Detecção da localização do mRNA de T em embriões de galinha por hibridação *in situ*

6.3.1. Preparação de plasmídeo linearizado para posterior produção de sonda T

De forma a caracterizar o padrão de expressão dos transcritos de Brachyury (T), foram realizados ensaios de hibridação *in situ* começando por otimizar as condições experimentais. Para tal, realizou-se a produção da sonda T necessária para os ensaios de hibridação *in situ* e procedeu-se a um ensaio de eletroforese para a detetar e confirmar que a digestão do plasmídeo tinha decorrido com sucesso (Figura 28).

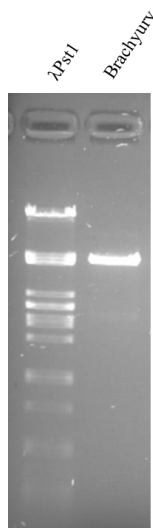


Figura 31 - Confirmação da digestão do plasmídeo para posterior síntese de sonda de T por eletroforese.

6.1.1. Hibridação *in situ*

Posteriormente, realizaram-se ensaios de otimização das condições experimentais para detetar posteriormente a localização do seu mRNA em embriões de galinha HH11, HH12 e HH13. Foram adquiridas imagens de forma a registar os resultados da marcação obtida nos embriões manipulados. Para tal, os embriões foram fotografados com o auxílio da câmara fotográfica Zeiss Axiocam 105 color que estava acoplada à lupa Zeiss, Discovery V12 do laboratório onde esta experiência decorreu (Figura 32).

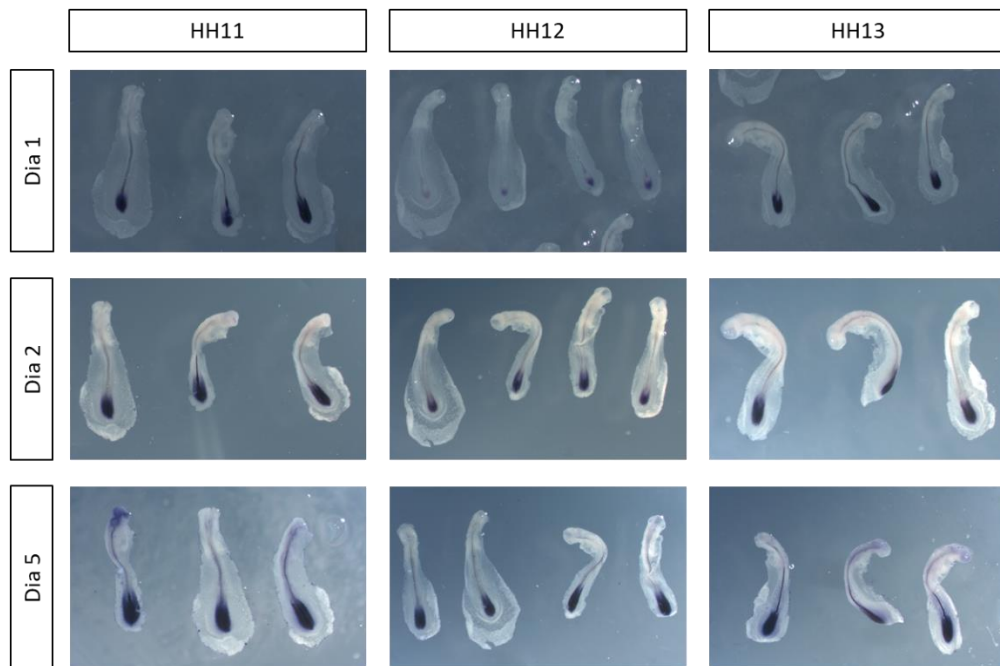


Figura 32 - Otimização da detecção da expressão do mRNA de Brachyury (T) por hibridação *in situ* em embriões de galinha HH11, 12 e 13, revelados ao longo de 5 dias.