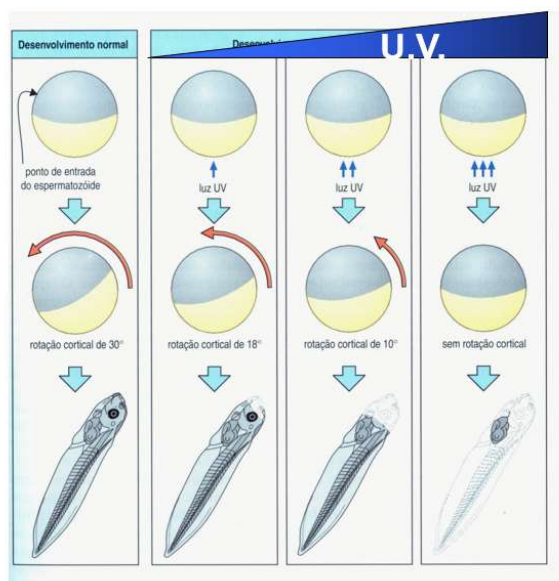


GRUPO 1

INTEGRANTES (nome e n. USP): Anna Lara Rocha Peres (12690024), Beatriz Perez Piccolo (11217663), Fernando Valls Yoshida (11246714), Karine do Nascimento Aragão (12683777).

Questão 1

Quantidades crescentes de Ultravioleta alteram o desenvolvimento embrionário



5



Como que o Ultravioleta estaria agindo?

Reconhecendo a importância do organizador de Spemann-Mangold para a definição do eixo dorso-ventral no embrião de *Xenopus laevis* e sua relação com o crescente cinza, consideremos as seguintes hipóteses:

HIPÓTESE 1: A radiação UV inibe a reorganização do citoesqueleto (i.e., a formação do crescente-cinza) necessária à formação do organizador de Spemann-Mangold e, consequentemente, à boa-formação do embrião.

HIPÓTESE 2: A radiação UV degrada os fatores indutores do organizador de Spemann-Mangold ainda no polo vegetal (i.e., antes do deslocamento). Não formar tal estrutura tem impactos diretos na boa-formação do embrião.

Para comparar essas hipóteses, há ao menos três pontos importantes desse experimento a serem considerados.

(i) A intensidade de UV incidido é inversamente proporcional ao ângulo de rotação cortical (resultado do experimento);

(ii) A intensidade de UV incidido é diretamente proporcional ao efeito de anomalias no desenvolvimento embrionário (resultado do experimento);

(iii) A rotação cortical, uma reorganização do citoesqueleto induzida pela entrada do espermatozóide, resulta na formação do crescente cinza. Nesse processo, são levadas ao crescente cinza vesículas carregadas com fatores como Wnt. Este fator desencadeia o processo da formação de um gradiente de β -catenina (associado a uma assimetria na distribuição de inibidores de BMP) que confere identidade dorsal. Esses eventos caracterizam o desenvolvimento normal do embrião. (conhecimento prévio).

Diante dessas condições, afirmamos que a hipótese 1 é mais produtiva que a hipótese 2. O ponto (i) é especialmente importante para o desempate: segundo a hipótese 1, quanto mais intenso o efeito de UV, menor o ângulo da crescente-cinza; então, mais prejudicada a formação do centro organizador e maior o comprometimento do embrião. A hipótese 2 não oferece explicação imediata para o ponto (i).

Com isso em mãos, oferecemos nossa conclusão.

CONCLUSÃO: O UV interfere na correta reorganização do citoesqueleto associada à formação do crescente-cinza e, conseqüentemente, à boa-formação do embrião, diante da base (i)-(iii) e segundo a hipótese 1.

Para restaurar o eixo do embrião da última coluna, o que pode ser feito? 5,0

Para restaurar o eixo embrionário no caso de não ter ocorrido rotação cortical, poderiam ser induzidos artificialmente fatores que levassem à reorganização dos microtúbulos e/ou induzir Wnt, Dsh e GBP exatamente no polo oposto ao ponto de entrada do espermatozóide – onde deveriam estar se a rotação cortical tivesse ocorrido após a fertilização.

Com isso, GBP e Dsh bloqueariam a ação de GSK3, impedindo a degradação de β -catenina, apenas na região dorsal (os núcleos dessa região receberiam β -catenina, mas os da região ventral não, formando um gradiente de fatores de identidade dorsal). Ainda, há a hipótese de injetar diretamente β -catenina na região dorsal.

Em qualquer uma das hipóteses, a β -catenina ativa, durante a clivagem, se distribuiria nos núcleos, se ligando a fatores de transcrição que codificam proteínas, os quais ativam os genes do organizador. Assim, a gastrulação poderia ter início, com as células que foram induzidas a expressar componentes do crescente cinza, as quais formarão as estruturas dorsais.

Aqui, levantamos uma nova hipótese: transplantar o lábio dorsal do blastóporo de um embrião normal (que não sofreu efeitos da radiação UV), uma vez que o mesmo contém o organizador, o qual apresenta capacidade indutiva. Por sua vez, o lábio dorsal do blastóporo secreta inibidores de BMP, para induzir destino neural (enquanto a expressão de BMP induz destino epidermal).



Questão 2

Durante a migração de crista neural, há redução de expressão de E-caderinas. Um embrião de galinha foi eletroporado na região truncal com um plasmídeo que permite a expressão persistente de E-caderina. Como se desenvolverá o sistema nervoso periférico deste animal? E as estruturas crânio-faciais? Como estaria o sistema nervoso central, nervos cranianos e sistema nervoso entérico?

A migração requer transição epitélio-mesenquimal e depende da expressão de E-caderina, que mantém as células presas à membrana basal, e também de N-caderina, que mantém as células unidas umas às outras (apesar desta última não ser expressa na CN truncal, somente mais tarde). Com a eletroporação na região truncal de um plasmídeo que irá permitir a expressão persistente de E-caderina, a migração será afetada, não ocorrerá a interação da matriz extracelular (especialmente a fibronectina) com células em migração, pois a membrana basal não será reduzida. Assim, ficarão comprometidas as estruturas formadas por progenitores de Crista Neural (CN) truncal.

E- caderinas
mediam adesão
célula-célula

redução da
membrana basal
não depende de
caderinas, mas
de
metaloproteases

No caso do experimento realizado, a hipótese levantada foi que as estruturas do Sistema Nervoso Periférico (neurônios sensoriais, simpáticos e células gliais satélite do SNP) seriam bastante afetadas, pois os precursores de seu desenvolvimento provêm da CN truncal. O funcionamento de glândulas e músculo liso do coração também serão afetados, pois os nervos simpáticos pós-ganglionares terão seu desenvolvimento comprometido. Além disso, o SN entérico será parcialmente afetado, já que neurônios que o controlam provêm da CN truncal.

As células que migram primeiro são as que têm mais potencial de gerar diversos tecidos como os que são as células da CN cranial. Elas formam derivados mesenquimais (tecidos esquelético e conjuntivo da cabeça e pescoço). Portanto, como a expressão de E-caderina vai afetar a migração de células da CN truncal, a princípio o SNC não é afetado. Em algumas espécies, todavia, a migração das células da CN cranial depende do fechamento do tubo neural; assim, se não houver fechamento na região truncal (por impedimento da migração das células da CN truncal), então mesmo estruturas formadas por progenitores da CN cranial (SNC e nervos cranianos) podem ser afetadas.

A migração de
crista neural e
fechamento do
tubo neural
ocorre na ordem
céfalo-caudal. o
fechamento do
tubo neural
cranial não seria
afetado pela
interferência em
CN truncais

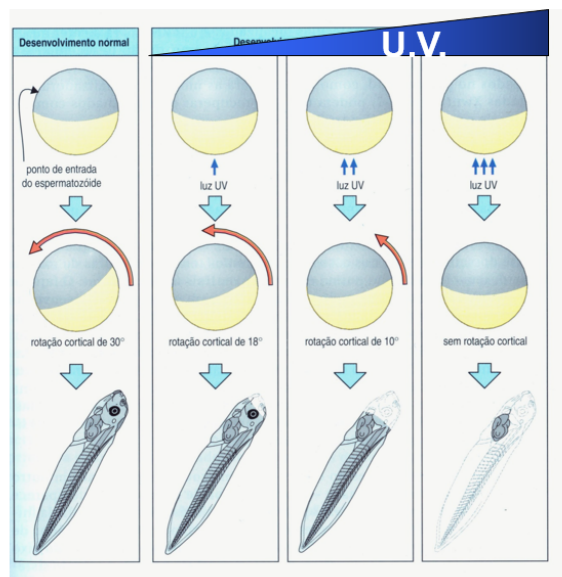
Logo, podemos concluir que a inibição da E-caderina é essencial para a formação correta do embrião a partir da análise da eletroporese em regiões distintas. Como visto, quando o procedimento é realizado na região da CN truncal, a má formação ocorre em estruturas providas desta área e estruturas que não possuem precursores nesse local não são comprometidas, como é o caso das estruturas craniofaciais e nervos cranianos que possuem precursores vindos de CN cranial.

GRUPO 1

INTEGRANTES (nome e n. USP): Maria Clara de Andrade Miranda (11736940)

Questão 1

Quantidades crescentes de Ultravioleta alteram o desenvolvimento embrionário



Como que o Ultravioleta estaria agindo?

5

O Ultravioleta reproduz o efeito da ausência do crescente cinza no desenvolvimento embrionário. Isso acontece porque o UV interrompe a polimerização dos microtúbulos responsáveis pela rotação, sendo assim o eixo não se desloca para 30°. Como visto na última coluna da imagem, com a maior incidência de radiação UV, não acontece a rotação cortical que resulta na assimetria radial, essa assimetria divide os eixos do embrião em dorsal e ventral. No eixo dorsal há sinalizadores específicos de Dsh que inibe o GSK-3, dessa forma a beta-catenina não é degradada e ativa a transcrição de genes alvo. Sem a presença de Dsh não há o desenvolvimento da região dorsal então há apenas a formação da “belly piece”.

Para restaurar o eixo do embrião da última coluna, o que pode ser feito?

5

Dado que a expressão de Dsh promove o bloqueio do GSK-3 e induz a atividade da beta-catenina, deve-se injetar RNA de Dsh na região correspondente à formação do eixo dorsal do embrião. Além disso, pode-se

injetar a beta-catenina na mesma região para que haja um acúmulo dela no núcleo, promovendo o desenvolvimento normal do embrião.

Questão 2

8

Durante a migração de crista neural, há redução de expressão de E-caderinas. Um embrião de galinha foi eletroporado na região truncal com um plasmídeo que permite a expressão persistente de E-caderina. Como se desenvolverá o sistema nervoso periférico deste animal? E as estruturas cranio-faciais? Como estaria o sistema nervoso central, nervos cranianos e sistema nervoso entérico?

A expressão persistente de E-caderina impossibilita o processo de migração da crista neural, então, nesse caso, haverá o comprometimento do sistema nervoso periférico do animal, pois o mesmo tem origem na região truncal da crista neural. O sistema nervoso central possui origem no tubo neural, por isso seu desenvolvimento não será afetado, porém, para que haja seu pleno funcionamento, é necessário que aconteça a comunicação entre sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, e na falta do último, haverá o comprometimento do sistema. As estruturas como esqueleto cranio-facial, cartilagens e nervos cranianos não serão comprometidas pois são advindas da crista neural cranial. Por fim, o sistema nervoso entérico é derivado da crista neural vagal e sacral, por essa razão também não serão acometidos pela inibição da migração da crista neural truncal. porque?

GRUPO 2

INTEGRANTES (nome e n. USP):

Karen Sayang Silva de Brito - 12608386

Lucas Leite Lins - 9876592

Lígia Felix de Araújo Almeida - 12606961

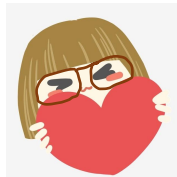
Mateus Gonçalves Miranda - 11367431

Gabriela Melo Vieira Braga - 11373011

Questão 1 **10**

O que aconteceria com um embrião de *Xenopus laevis* que foi injetado com uma forma dominante-negativa do GSK3 no estágio de uma célula? Uma proteína dominante-negativa é uma proteína inativa que anula a ação enzimática da proteína normal. O que acontece com os níveis de beta-catenina e com o desenvolvimento do eixo embrionário?

Resposta: O GSK3 é uma das proteínas responsáveis pela formação do eixo dorso-ventral, participando da degradação de beta-catenina. Portanto, uma forma dominante-negativa de GSK3 acarretaria no aumento dos níveis de beta-catenina, uma vez que sua degradação foi interrompida, o que a princípio afeta o desenvolvimento dorso-ventral do embrião. Sendo assim, o nível elevado de beta catenina estimula a expressão de genes da região dorsal, alterando visualmente sua forma ao não distinguir entre região dorsal e ventral, o que resulta em um embrião com a região encefálica avantajada.



Questão 2 10

Você está pesquisando como que o ectoderma do *Xenopus* se diferencia em epiderme ou tecido nervoso. Você faz 2 experimentos:

- A) Marca com fluorescência algumas células do ectoderma dorsal do embrião (mapa do destino) e segue o desenvolvimento das células marcadas
- B) Cultiva um pedaço do ectoderma dorsal em cultura. Após 2 dias de cultura, determina a identidade de epiderme ou neural usando marcação por imunofluorescência.

O resultado em A, todas as células são neurais. Em B, tanto células neurais quanto epidermais são formadas. Explique esta diferença.

Resposta: Na situação A, é possível que as células do ectoderma marcadas fossem adjacentes à notocorda, local que produz inibidores de BMP e, consequentemente, induz a diferenciação em células neurais e posterior formação da placa neural. Na situação B, foram vistas células de outras regiões do ectoderma, incluindo regiões mais distantes da notocorda ou até mesmo sem a presença da notocorda, locais que sofrem menor influência de inibidores de BMP. O BMP é responsável por promover a formação da epiderme, logo o aumento no seu nível de concentração através da ausência de inibidores explica as células epidermais observadas no experimento.

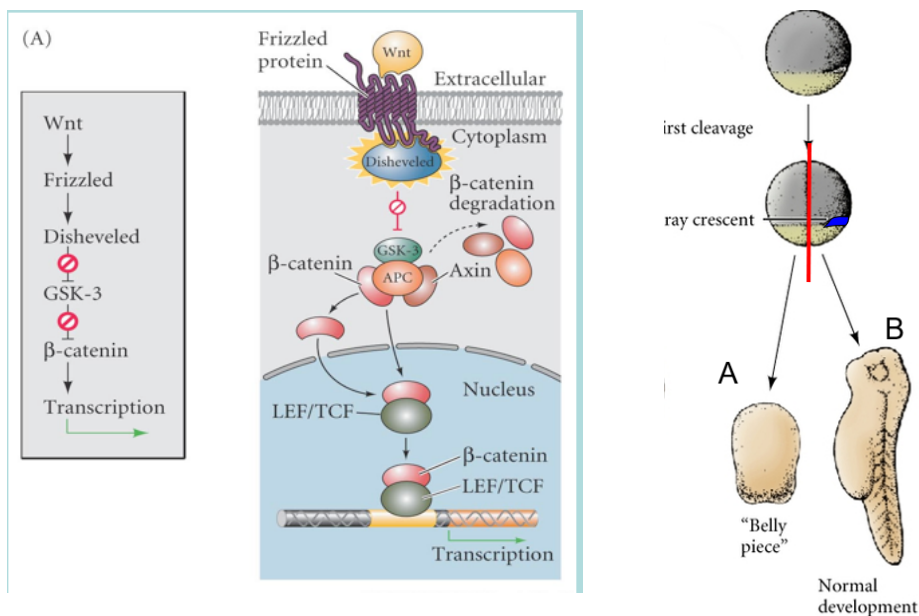
GRUPO 3

INTEGRANTES (nome e n. USP):

<u>Giovanna Costa Villefort</u>	<u>NºUSP: 10728000</u>
<u>Luiza Prette Fiorotti</u>	<u>Nº USP: 10255914</u>
<u>Sabrina Yukari Santos Hacimoto</u>	<u>NºUSP: 11322494</u>

Questão 1 10

O Cloreto de Lítio inibe o GSK-3 da via do Wnt. O que aconteceria se o embrião A fosse deixado de molho em cloreto de lítio? E se fosse o embrião B?



Estamos cientes de que a ação inibidora de GSK-3 exercida pelo cloreto de lítio é equivalente à ação de Dsh, onde esta inibição resultaria na transcrição de genes específicos determinada pela β-catenina, resultando na secreção de inibidores de BMP, que possuem a capacidade de converter as células vizinhas em tecidos dorsais, e resultar na formação de um eixo neural.

Entretanto, como os embriões em questão irão ficar inseridos, de molho, no cloreto de lítio, todas as células teriam seu GSK-3 inibido, logo a desigualdade transcripcional que seria gerada por tal ação, não ocorre. Todo o embrião passaria a expressar então características dorsais, perdendo a diferença espacial que comumente ocorreria.

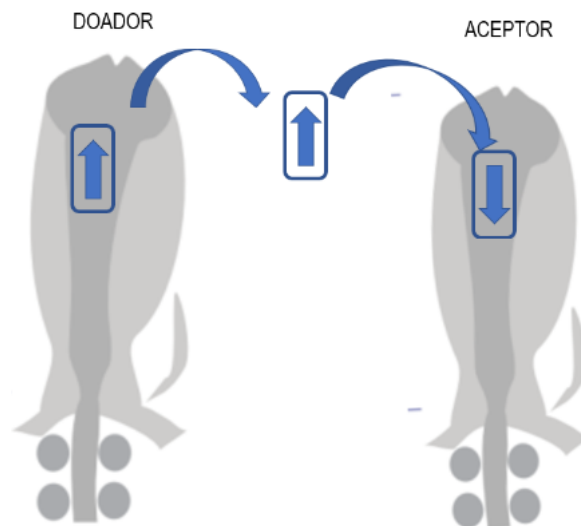
Por fim, ambos os embriões concluíram o experimento de maneira similar, com todo seu comprimento expressando características dorsais. (O cabeção).

cabeção. Gostei



Questão 2 10

No seu projeto de Iniciação Científica, você resolveu inverter a posição da crista neural cranial no transplante. Preveja o que aconteceria e como você poderia provar a sua previsão.



Uma vez que a crista neural cranial irá formar os doze pares de nervos cranianos, além do esqueleto craniofacial, acreditamos que seu transplante de maneira invertida, ocasionaria uma inversão na formação destes pares de nervos, uma vez que estas células apresentam características já pré definidas e além disso, possuem somente a capacidade de migração dorso-ventral e não o inverso, logo não teriam a capacidade de se realocarem. Assim, a ordem dos pares de nervos cranianos ficaria decrescente (XII, XI, X ...).

A respeito da formação do esqueleto craniofacial uma vez que sua indução também estaria alterada, concluímos que aconteceriam diversas deformidades, possivelmente inviabilizando o embrião.

Para provar a previsão, poderíamos utilizar análises de imunohistoquímica, com visualização por microscopia de fluorescência, por exemplo. Através da marcação de células referentes à determinado par de nervos cranianos, já conhecidas, anteriormente ao transplante, poderíamos observar a migração destas após a inversão de sentido em seu realocamento. Espera-se que as células se encontrem em locais invertidos à relação anterior. Além disso, a partir do momento em que o esqueleto craniofacial começar a se desenvolver, possivelmente se poderá observar que este está propenso a diversas deformidades, com a escassez da presença de características comuns aparentes.

GRUPO 4

INTEGRANTES (nome e n. USP):

Eliezer Almeida ; 9820404

Nélia Mané, 11875779

ireneyan@usp.br

9,5

Questão 1:

O que ocorre com a expressão de Noggin e Chordin (Inibidores de BMP) nestes embriões?

a) Sem crescente cinza

Sem crescente cinza, não há rotação cortical e portanto não há também a definição da região dorsal, e esta é a responsável pela secreção de inibidores de BMP. Sendo assim, a expressão de Noggin e Chordin não aconteceria.

b) Com microinjeção de beta-catenina exógena no pólo ventral

Visto que no polo ventral não há Dsh, a beta-catenina será degradada livremente pela GSK-3. Caso seja injetado beta-catenina em excesso, de forma que GSK-3 não consiga degradar por completo a beta-catenina, a quantidade restante de beta-catenina seguirá sua transdução de sinal normal, internalizando no núcleo e expressando genes associados a região dorsal.

c) Com microinjeção de beta-catenina exógena no pólo dorsal

A beta-catenina na região dorsal não é degradada pela GSK-3 (devido a ação de Dsh) e portanto pode internalizar no núcleo e auxiliar na expressão de genes específicos

E noggin e chordin fazem parte destes genes específicos?

d) Com microinjeção de GSK3 exógena no pólo ventral

Nesta região, já existe GSK-3 ativa, de forma que uma microinjeção exógena não afetará o desenvolvimento dessa região

e) Com microinjeção de GSK3 exógena no pólo dorsal

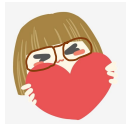
Se houver Dsh (presente no polo dorsal) suficiente, as enzimas GSK3 serão inibidas por Dsh e não haverá diferença significativa. Caso seja injetado GSK3 em excesso, os níveis de beta-catenina vão diminuir e a expressão dos genes característicos da região dorsal podem ser afetados.

Um embrião de galinha foi eletroporado com RNA antisense para Wnt com as seguintes variações:

- 1) Na placa neural cefálica
- 2) No tubo neural cefálico após o seu fechamento:
- 3) No ectoderma dorsal caudal no fim da gastrulação:
- 4) No tubo neural caudal após seu fechamento.

Quais experimentos você faria para determinar quais foram as estruturas afetadas em cada um destes experimentos?

- 1) Consequência no desenvolvimento: comprometimento da determinação da borda da placa neural que originará a crista neural, na região cefálica, afetando consequentemente a transição epitélio mesênquima e a migração de células. Sendo assim, a formação esqueleto crânio-facial, nervos cranianos, dentes e células tireoidianas serão comprometidas.
- 2) No tubo neural, a maior concentração de Wnt define sua região dorsal. Portanto, com a inibição da atividade de Wnt na região cefálica do tubo neural, o eixo dorso-ventral será comprometido, o que a nível cefálico, pode afetar o desenvolvimento de órgãos cefálicos como cérebro, tronco encefálico e cerebelo
- 3) O ectoderma é responsável pela formação da placa neural e do tecido epitelial. Com a inibição de Wnt, a região dorsal caudal do ectoderma que originará a placa neural irá apresentar comprometimento na formação das estruturas caudais da crista neural (cristas troncal e sacral)
- 4) Mais uma vez, a inibição de Wnt no tubo neural afetará a caracterização da região dorsal que, a nível caudal, corresponde no comprometimento da diferenciação de células sensoriais da futura medula espinhal.



sim, não foi abordado em aula: a sinalização Wnt regula níveis de expressão do transdutor de sinal do Shh (Gli3).



Experimentos: Podem ser feitos experimentos de imunofenotipagem para verificar a ausência das estruturas citadas acima, em cada caso. Podem ser utilizados também marcadores para as regiões citadas acima e comparar os resultados com um embrião normal.

GRUPO 5

INTEGRANTES (nome e n. USP):

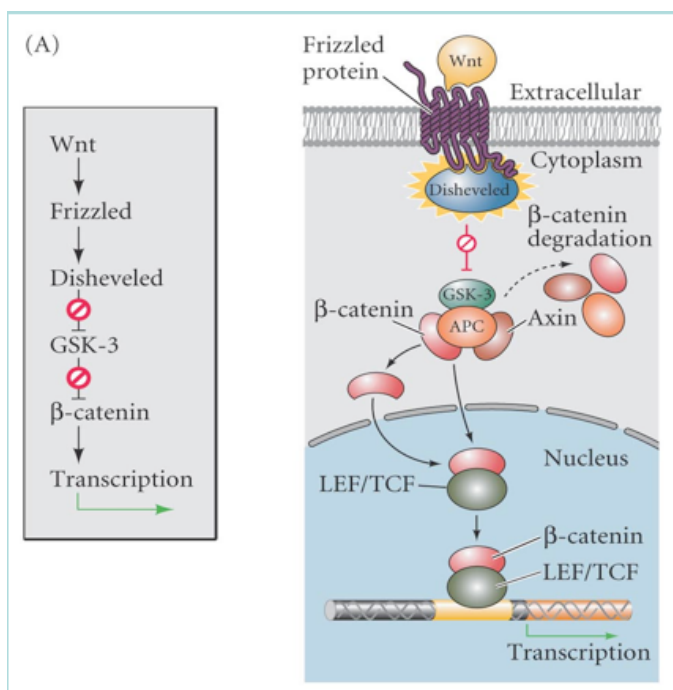
Gabriela Bergamo Campoi N° USP 11818750

Gabriela Mari Onishi N°USP 11818739

Marina Dutra Basile N°USP 11790497

Questão 1:

O Cloreto de Lítio inibe a ação do GSK3. Foi realizado o seguinte experimento: antes do transplante, o Organizador foi deixado de molho em solução com Cloreto de Lítio por 1h. Após, foi transplantado para o pólo ventral do embrião aceptor. Como se desenvolve este embrião aceptor? Como é o padrão de expressão de Noggin (inibidor de BMP)?



10

Resposta

O GSK3 é responsável pela ativação da metabolização da B-catenina, portanto, ao ser inibido pelo cloreto de lítio, haverá acúmulo de B-catenina no polo dorsal do embrião receptor. A B-catenina induz a expressão de noggin na região dorsal, então tendo maior concentração de B-catenina, haverá maior concentração de noggin. Ao transplantar o Organizador para o polo ventral do embrião aceptor, o noggin presente vai inibir a BMP 4 no local. Haverá então a formação de tecido nervoso na região ventral do embrião, a partir da ectoderme, por ação do noggin, e o embrião apresentará eixo duplo.

Que experimentos poderiam ser realizados para demonstrar a origem das células que formam a medula adrenal? Além disso, suponha que uma das suas hipóteses é que o desenvolvimento destas células depende da sinalização da via de FGF. Como você demonstraria isso?

Um experimento que poderia ser realizado para demonstrar a origem das células que formam a medula adrenal seria marcar as células de crista neural, por exemplo (caso a hipótese fosse essa), inserindo um marcador fluorescente na membrana celular. Assim, seria possível seguir a migração das células e entender se elas fazem parte do desenvolvimento da medula adrenal.

Para comprovar a hipótese de que o desenvolvimento dessas células depende da sinalização da via de FGF, um experimento possível seria inibir a via de FGF na região de células de crista neural truncal, já que a medula adrenal vem de células de crista neural provenientes da região truncal. Além disso, outra forma seria marcar regiões diferentes da crista neural em embriões distintos, para se definir qual faixa truncal contribui com o desenvolvimento da medula adrenal.

GRUPO 6

INTEGRANTES (nome e n. USP):

Igor Rodolpho Matheus Silva 10850706

Flávia Faria Formagio Fonseca 9789768

Alana Marcela Azarias Severino 9677374

Vitória Escóssio Gutiérrez 10757880

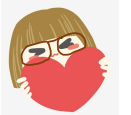
Questão 1

10

O transplante de Spemman foi realizado num embrião de *Xenopus*. Posteriormente, este embrião ficou de molho em uma solução com BMP. Como que ele se desenvolveria? Como estaria distribuído a beta-catenina deste embrião? E se o mesmo embrião crescesse de molho numa solução com Noggin (inibidor de BMP)?

Quando imerso em BMP, o embrião todo assume um destino epidermal, não desenvolvendo a parte dorsal, ou seja, não desenvolve eixo neural. A distribuição de beta-catenina continuará desigual pelo embrião, com mais beta-catenina na região que se desenvolveria em dorsal.

No caso de o embrião se desenvolver de molho em uma solução com Noggin, a concentração de BMP será a mesma para todas as células do embrião, o destino de todas será formar o eixo neural.



Questão 2

5,0

A síndrome de DiGeorge é causada por uma microdeleção no braço curto do cromossomo 22 (22q11.2). Seus sintomas são variados. Os pacientes podem apresentar algumas ou todas destas características:

- Anomalias craniofaciais
- Anomalia cardíaca (e.g. tronco arterioso ou defeitos nas septação aorticopulmonar)
- Perda auditiva (tanto por razão condutora quanto sensorial)

porque a emigração e não algum outro evento? por exemplo, redução no número de células da crista? Ou morte celular da crista neural?

Qual deve ser o evento embriológico mais afetado? Que experimento você poderia fazer para comprovar esta hipótese?

- evento mais afetado seria a ativação dos genes de emigração durante a formação da crista neural
- sequenciamento do genoma do indivíduo

O sequenciamento todo sai muito caro e é tecnicamente difícil. Mas mesmo que sequencie, existem muitos genes numa microdeleção, como saber quais estão agindo na crista neural?