

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO OLHO

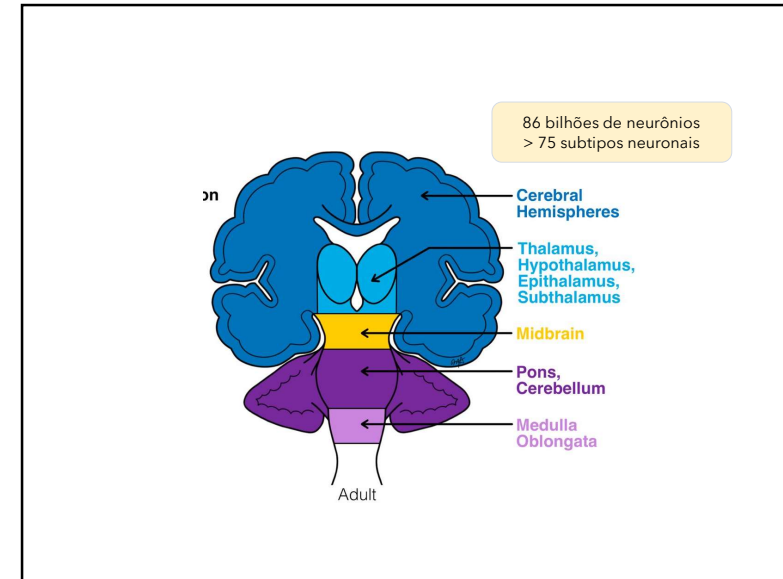
ireneyan@usp.br

Dep. Biologia Celular e do Desenvolvimento ICB

1. Introdução: o que é Biologia do Desenvolvimento
2. Embriologia Clássica do SNC
3. Embriologia Clássica e Molecular do olho
4. Projeções axonais da retina

1

1



2

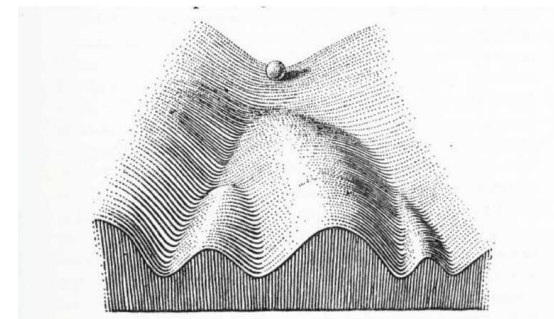
EMBRIOLOGIA CLÁSSICA



3

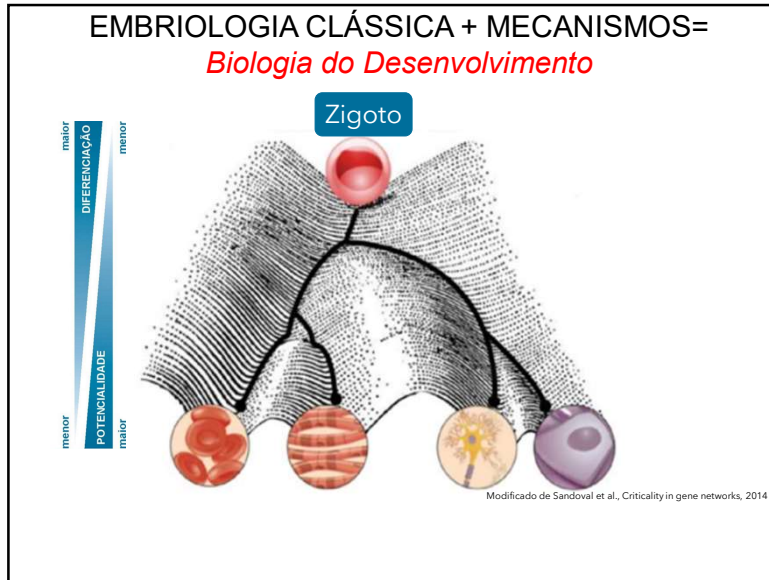
3

EMBRIOLOGIA CLÁSSICA + MECANISMOS= *Biologia do Desenvolvimento*

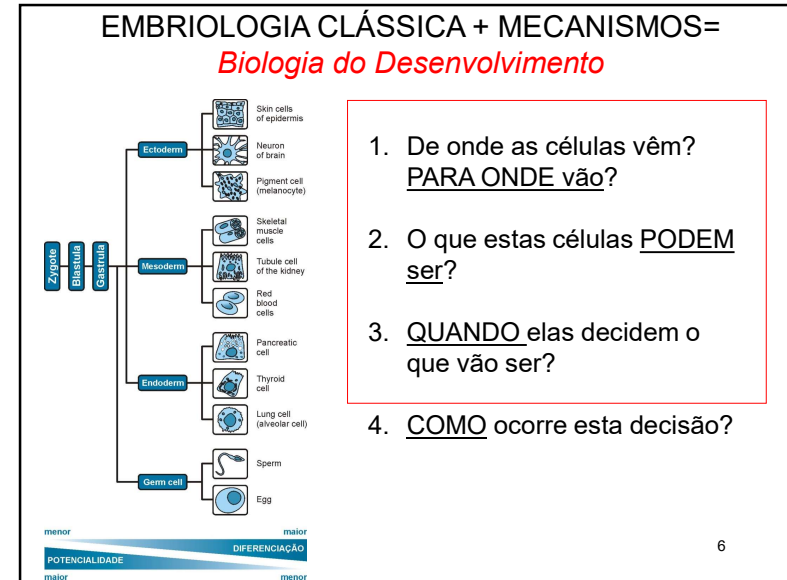


Paisagem de Waddington (1957)
The Strategy of the Genes

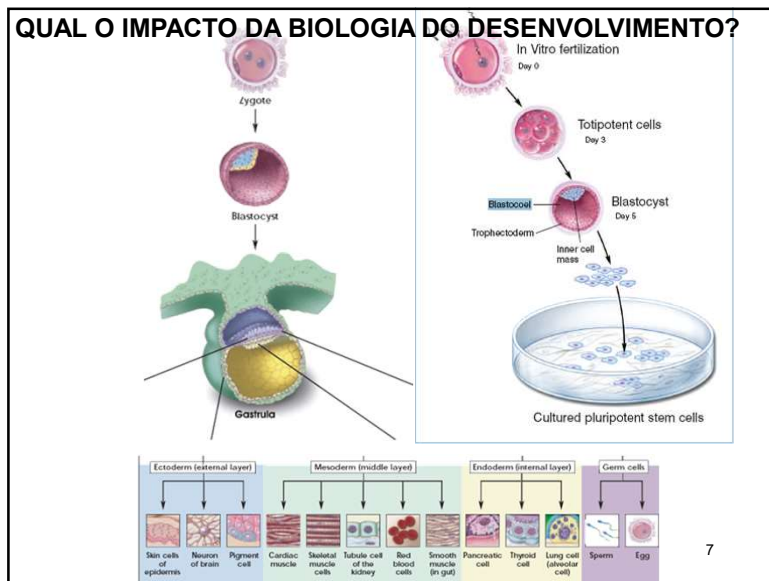
4



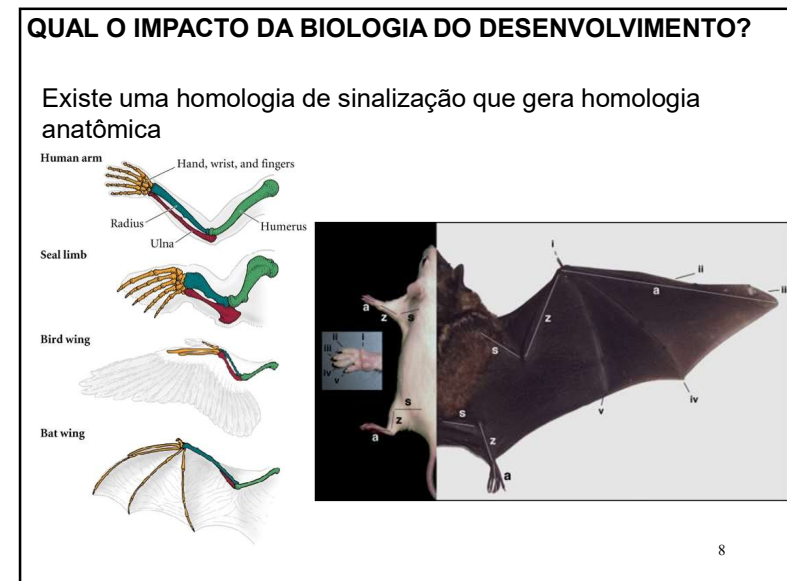
5



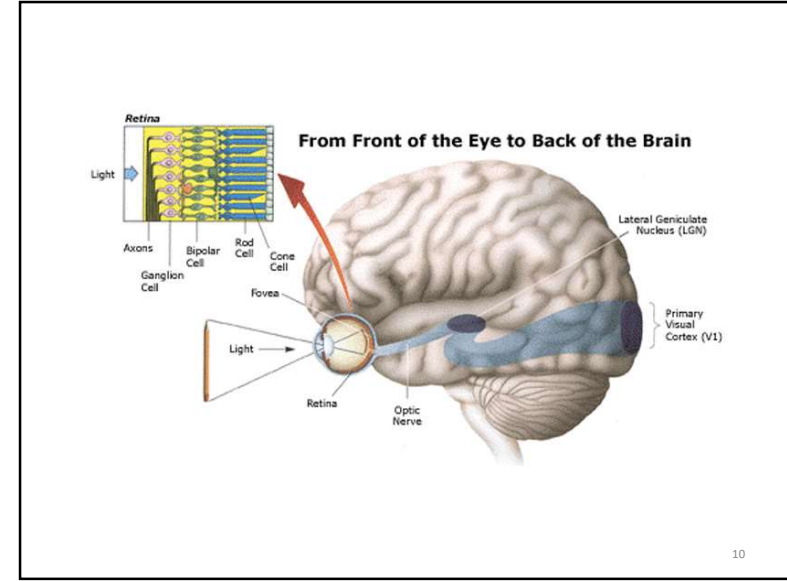
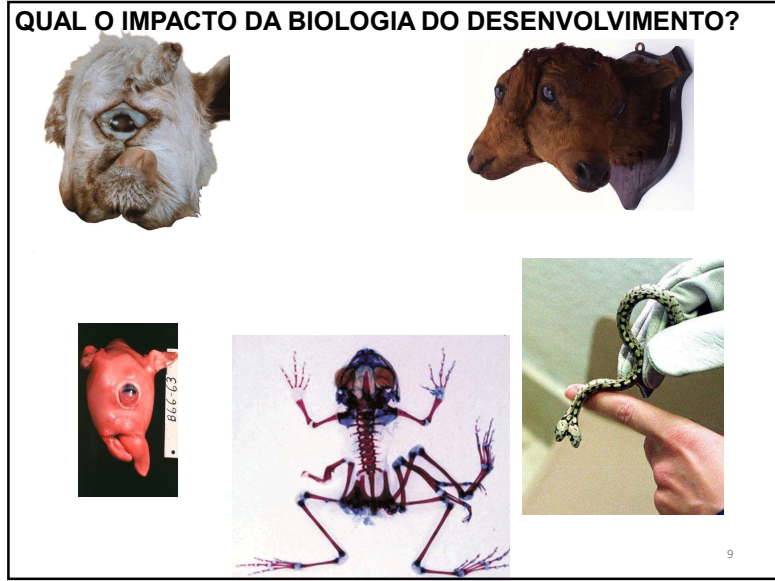
6



7



8



1) COMO QUE OS COMPONENTES OCULARES SÃO FORMADOS?

Componentes do olho para melhor ajustar a imagem

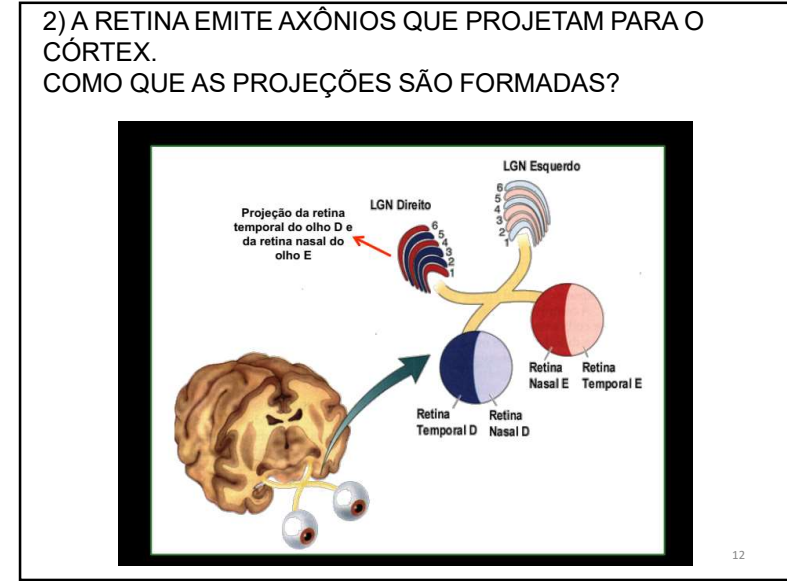
Lentes
 córnea (difração fixa; 42D)
 cristalino (difração variável; mais 12D)

Pupila
 Miose (músculo constritor da pupila)
 Midríase (músculo dilatador da pupila)

Músculos extrínsecos do olho
 Movimentos oculares

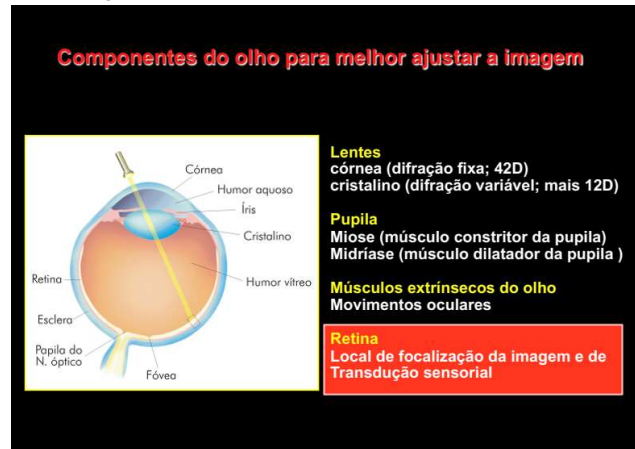
Retina
 Local de focalização da imagem e de Transdução sensorial

11



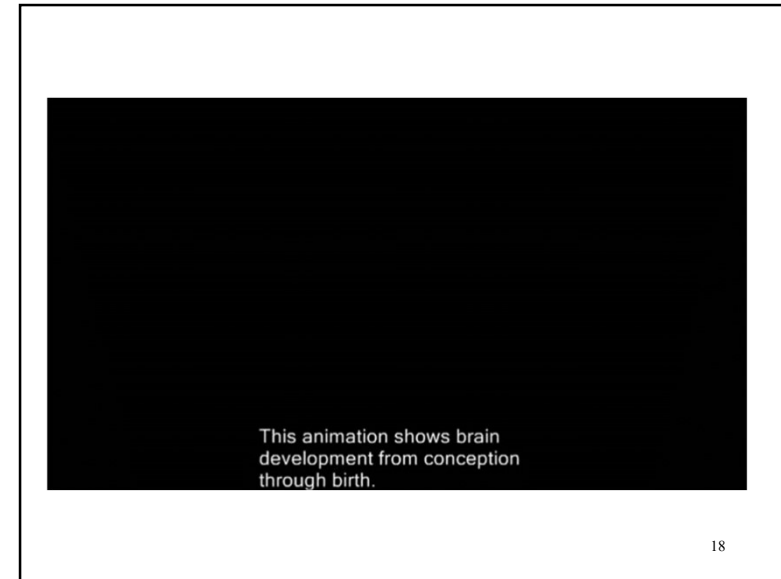
1) COMO QUE OS COMPONENTES OCULARES SÃO FORMADOS?

De onde surge?



17

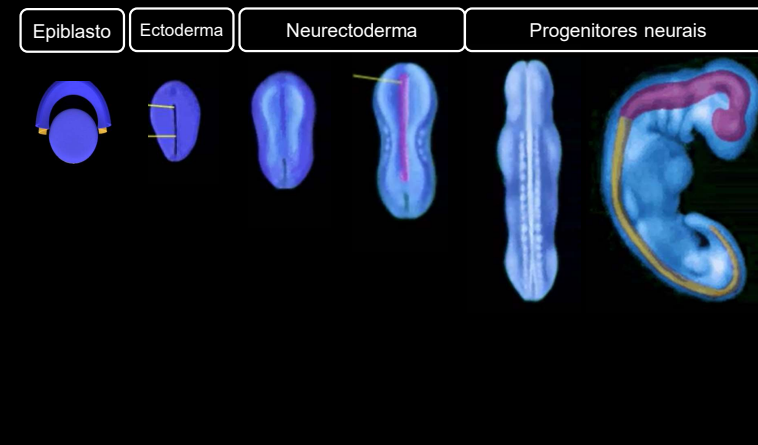
17



18

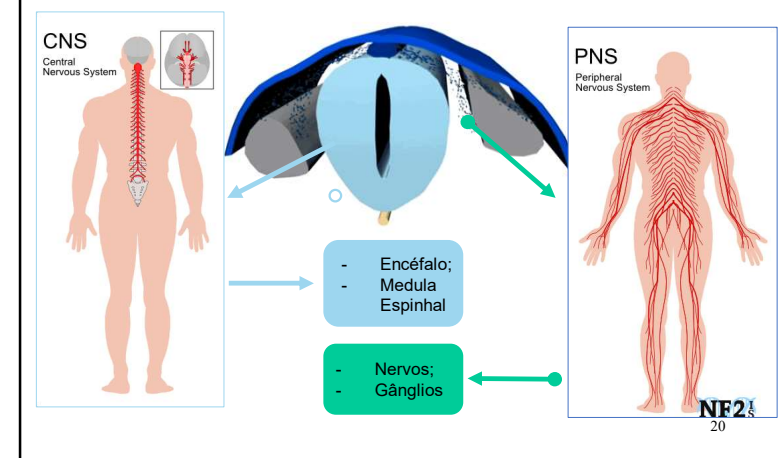
18

Aspectos anatómicos do desenvolvimento neural inicial

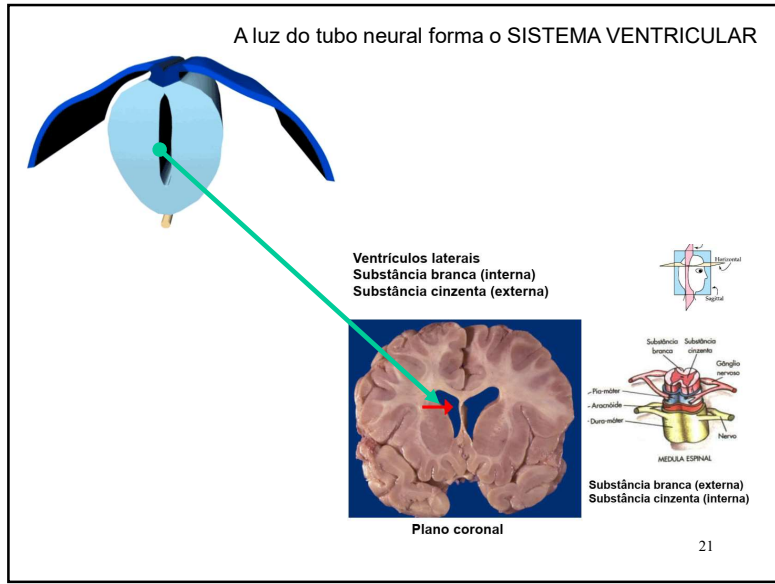


19

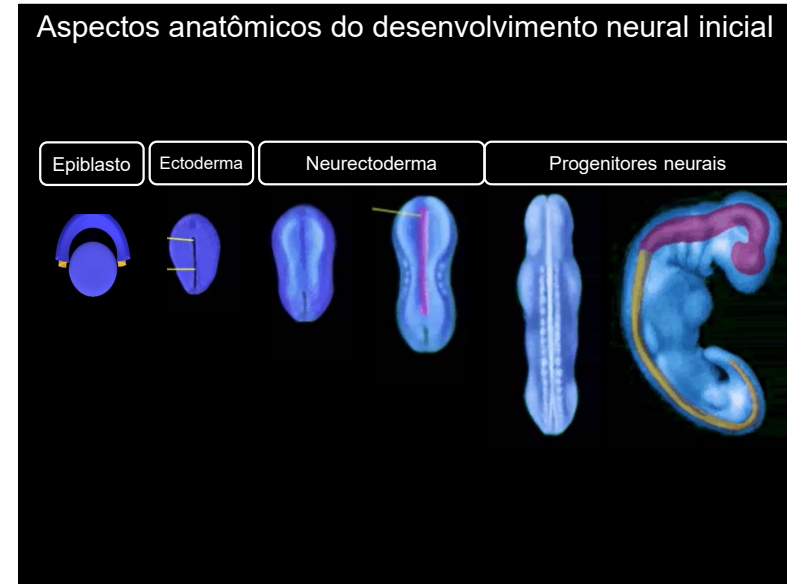
O tubo neural forma o Sistema Nervoso CENTRAL e as células da crista neural o Sistema Nervoso PERIFÉRICO



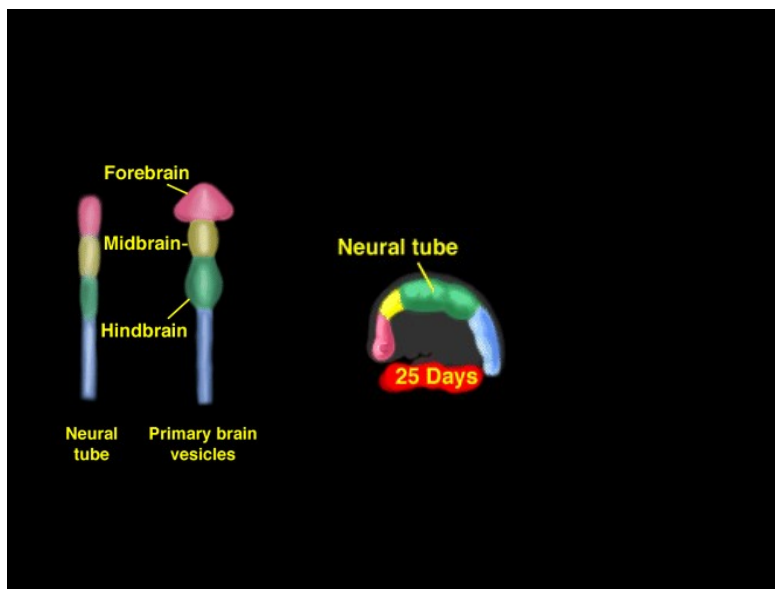
20



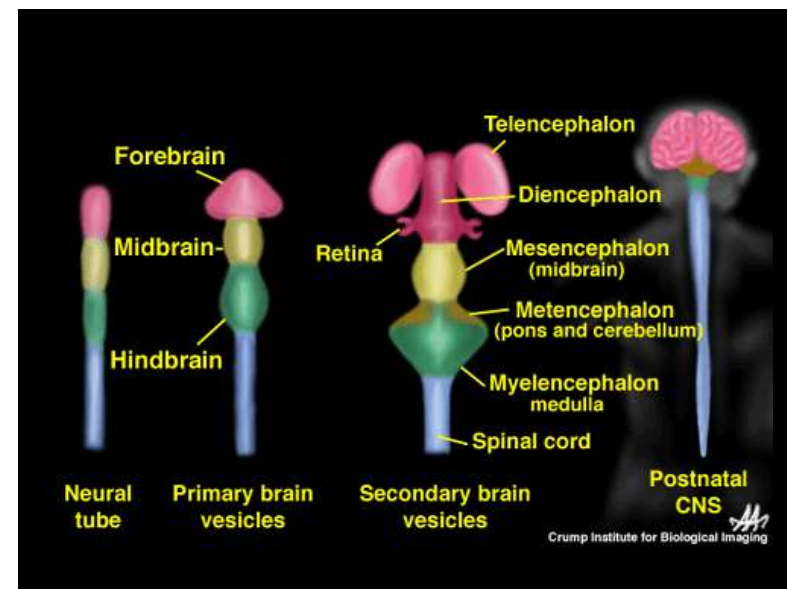
21



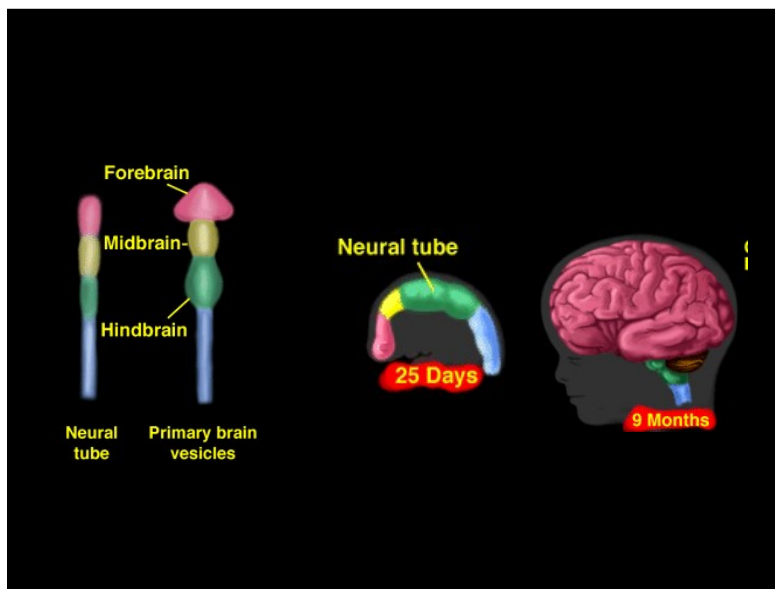
22



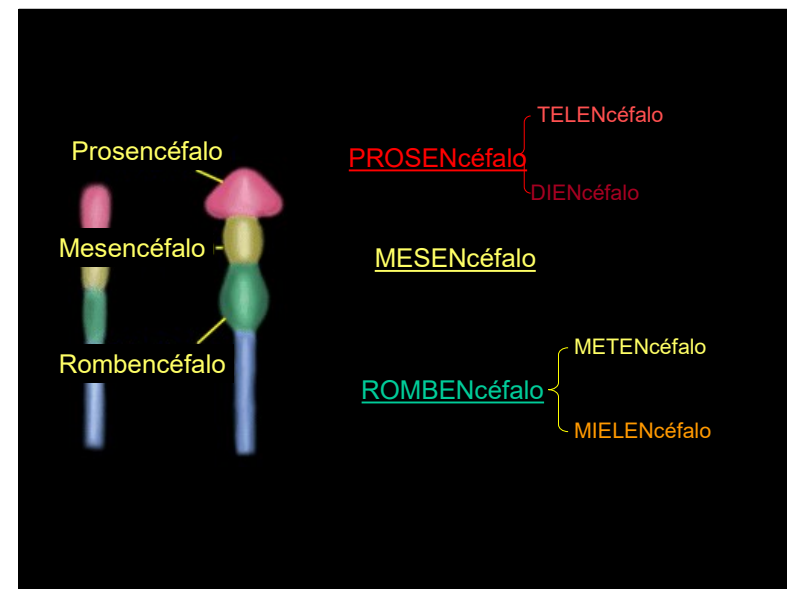
23



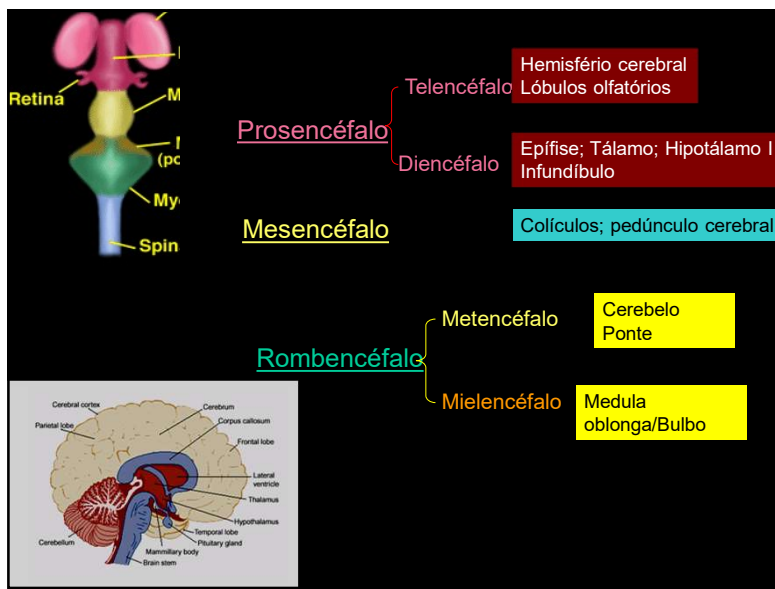
24



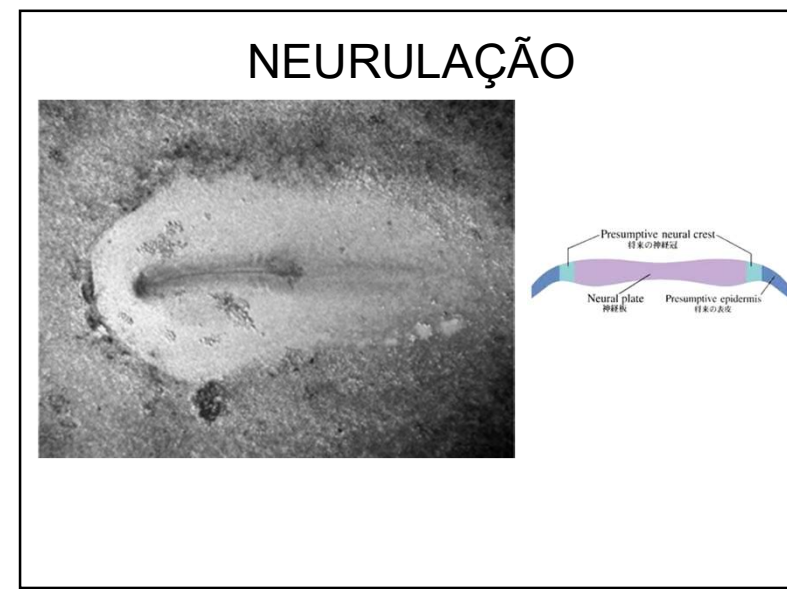
25



26

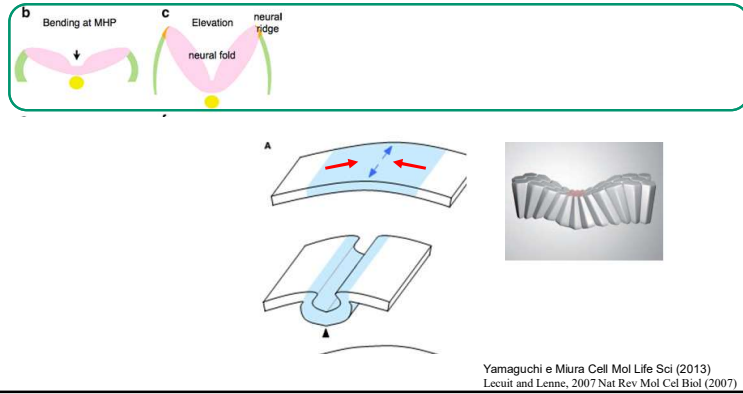


27



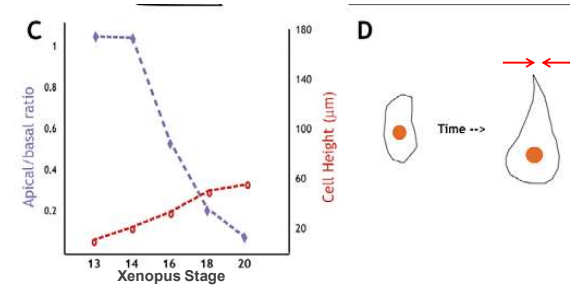
28

O que move Dobradiça Medial (MHP)?



29

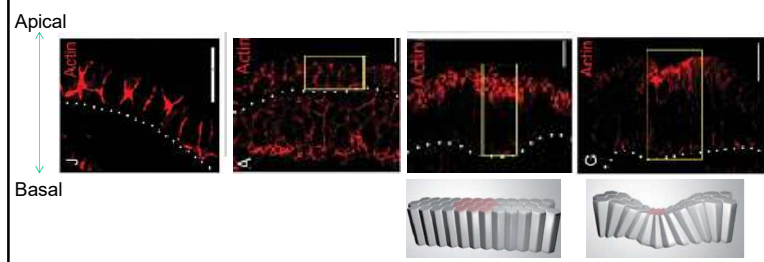
O crescimento apico-basal é seguido de redução da superfície apical



Modificado de Lee et al., Development (2007)

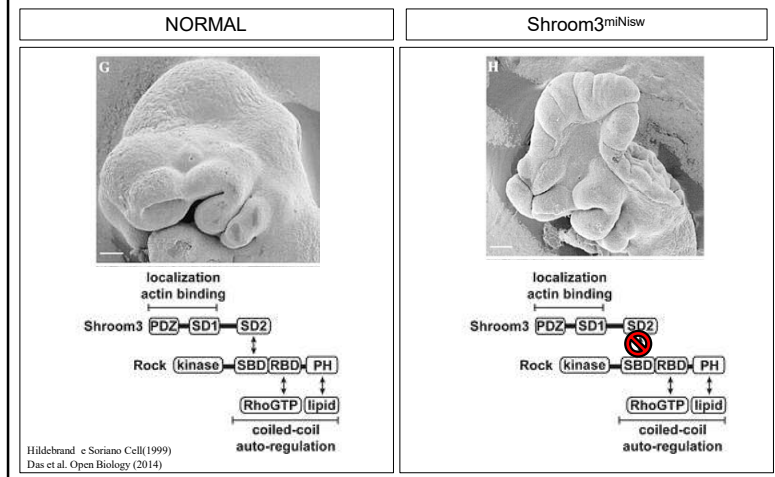
30

A CONSTRIÇÃO APICAL é a redução de área pela contração da rede de actina-miosina apical



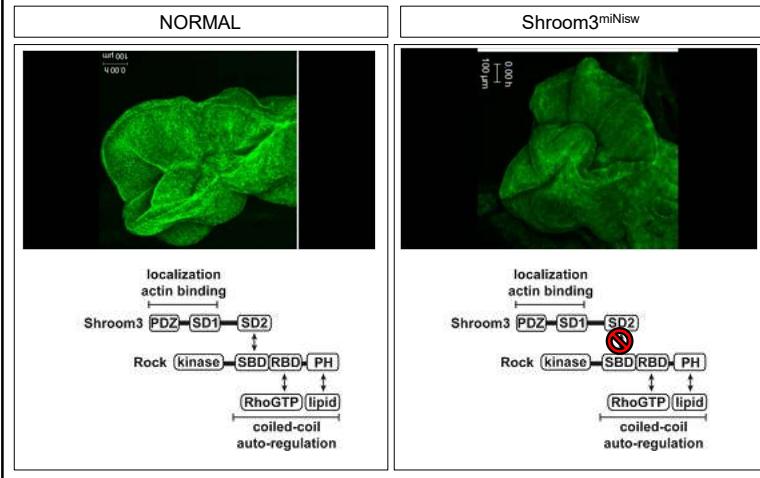
31

A constrição apical é essencial para o fechamento do tubo neural



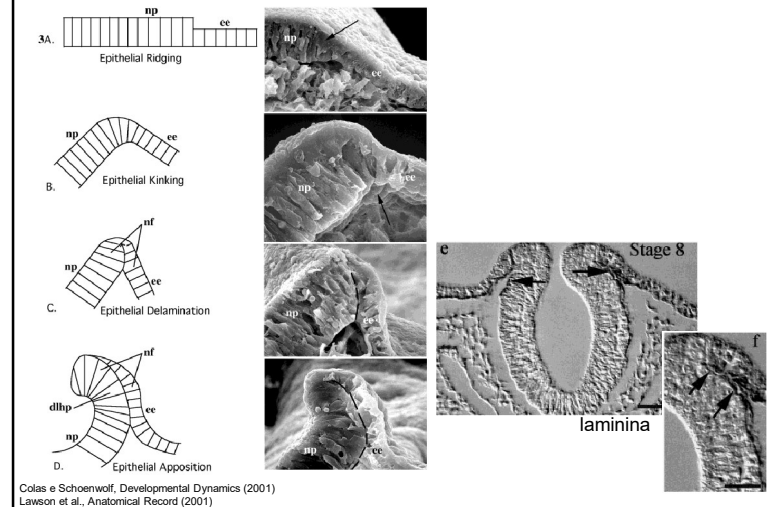
32

A constrição apical é essencial para o fechamento do tubo neural



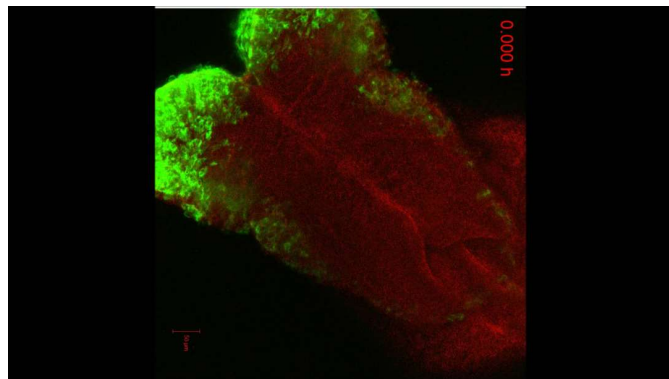
33

A porção basal do ectoderma não-neural interage com a porção basal das dobras neurais



34

Durante o fechamento do tubo neural o ectoderma não-neural é extremamente ativo
Visão transversal:

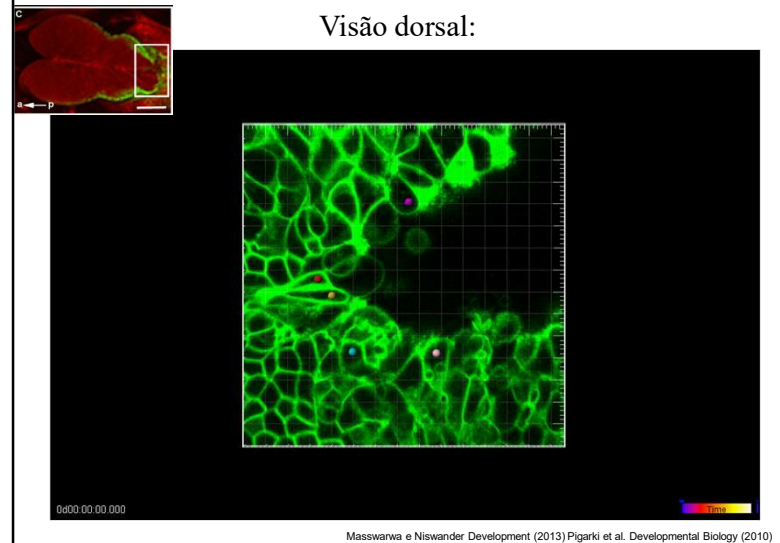


Grh13-Cre/mTomato-mGFP double transgenic
Grh13: protease expressa nas bordas neurais

Heather Ray in Niswander Lab, U. Colorado, EUA

35

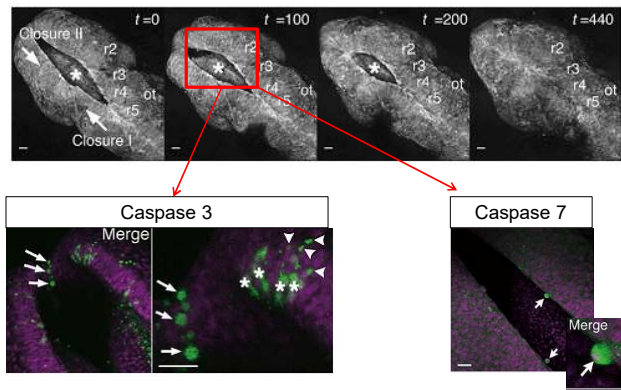
Visão dorsal:



Masswanwa e Niswander Development (2013) Pigarki et al. Developmental Biology (2010)

36

A apoptose é um componente importante no fechamento do tubo



Yamaguchi et al., Journal of Cell Biology (2011)

37

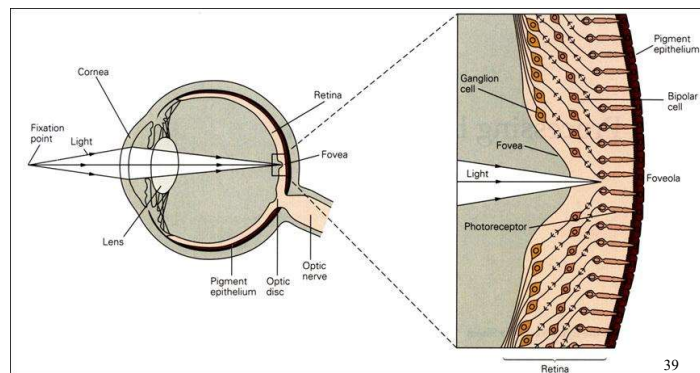


38

38

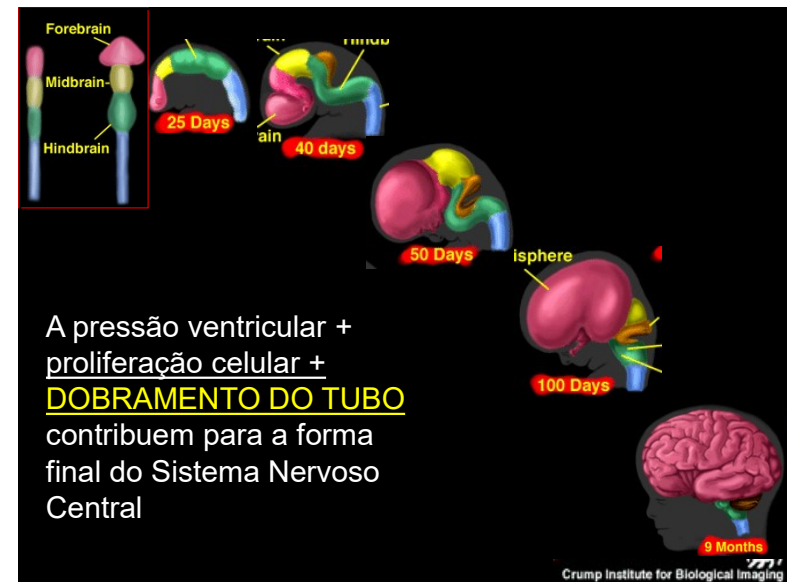
1) COMO QUE OS COMPONENTES OCULARES SÃO FORMADOS?

Como que eles são definidos



39

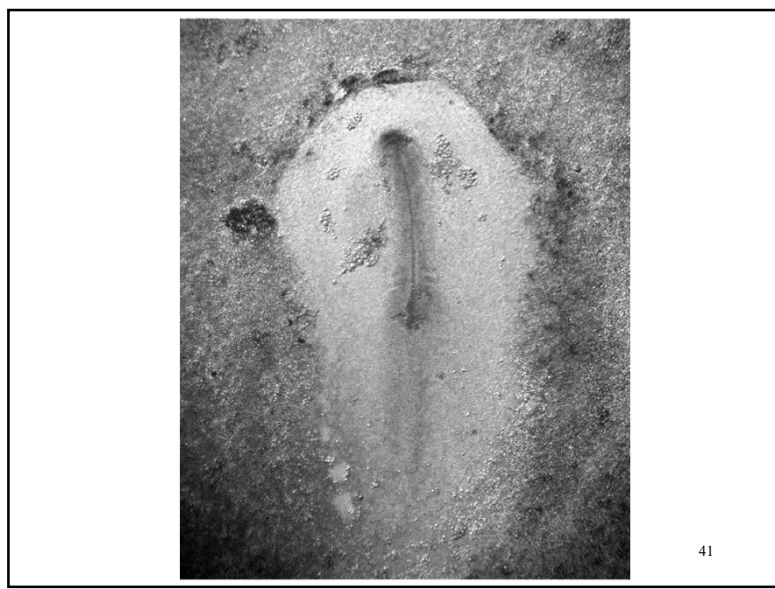
39



A pressão ventricular +
proliferação celular +
DOBRAMENTO DO TUBO
contribuem para a forma
final do Sistema Nervoso
Central

Crump Institute for Biological Imaging

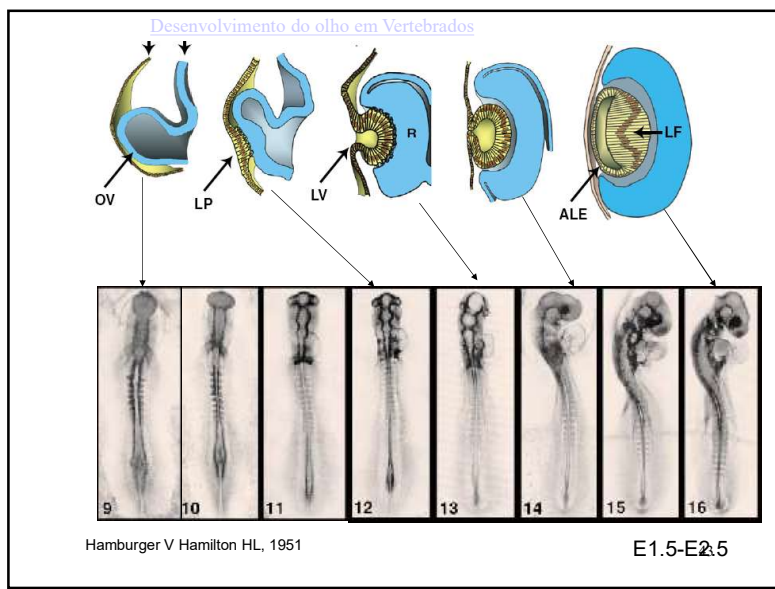
40



41



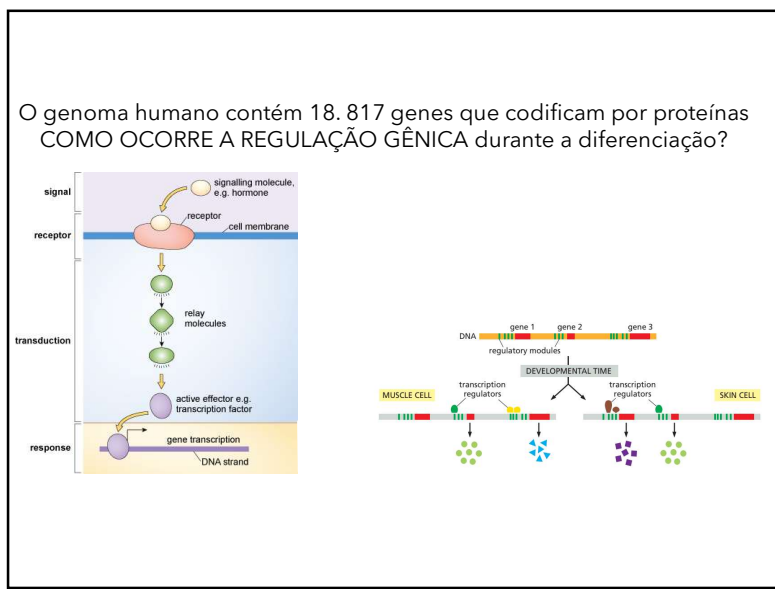
42



Hamburger V Hamilton HL, 1951

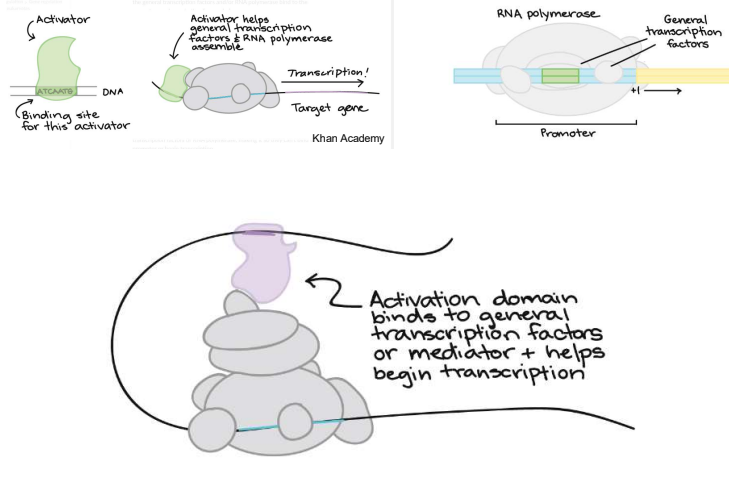
E1.5-E2.5

43



44

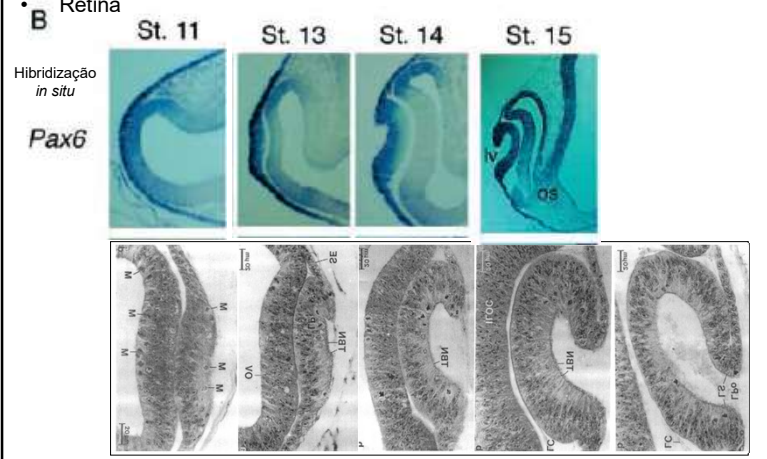
Um fator de transcrição que ativa expressão gênica favorece a formação do complexo de transcrição no promotor



45

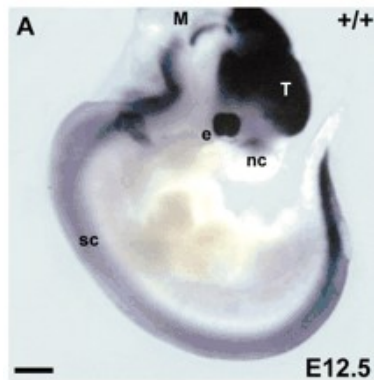
Pax6 é um fator de transcrição (proteína nuclear) que está presente nas futuras células da:

- Córnea
- Cristalino
- Retina



46

PAX6 está presente em outros locais do embrião de camudongo



November 1, 2002 Development 129, 5041-5052.

47

Hipótese: A presença do fator de transcrição Pax6 é necessária para formação de olho

COMO PROVAR ISTO??

- Não precisa, o padrão de expressão já prova isto
- Fazer imunohistoquímica/fluorescência para Pax6
- Remover PAX6
- Aumentar a expressão de Pax6

48

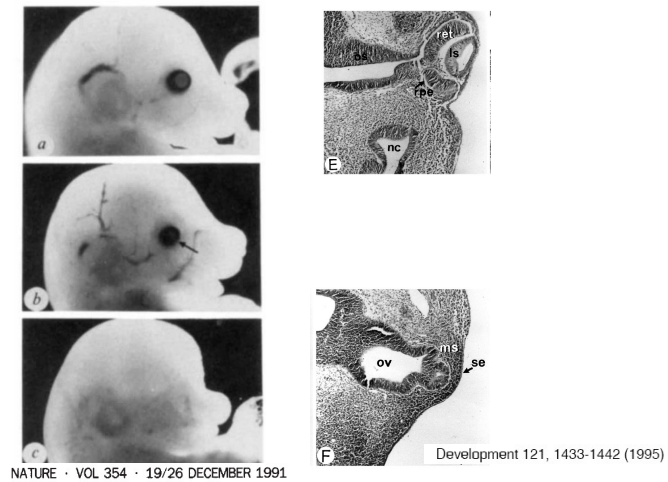
Hipótese: A presença do fator de transcrição Pax6 é necessária para formação de olho

COIMO PROVAR ISTO??

- a) Não precisa, o padrão de expressão já prova isto
- b) Fazer imunohistoquímica/fluorescência para Pax6
- c) **Remover PAX6**
- d) Aumentar a expressão de Pax6

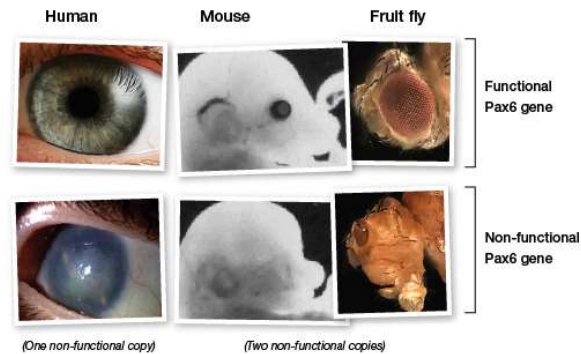
49

A mutação do gene Pax6 é deletéria para o desenvolvimento ocular em camundongos



50

Espécies com defeito de expressão de Pax6 têm defeitos oculares congênitos



<http://learn.genetics.utah.edu/content/variation/toolkit/>

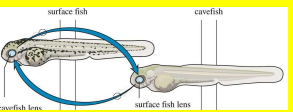
51

O peixe-cego das cavernas mexicanas




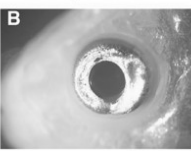


52

52



A lente e apenas a lente é transplantada para o lado esquerdo de uma espécie para outra e foram avaliadas a formação de olhos (lente e retina)


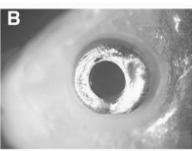


DE	PARA
Superfície	Caverna
Caverna	Superfície

Control Side	Transplant Side
	
	

53

Podemos concluir que:


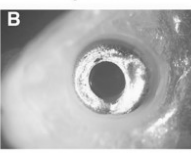


- a) A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie aceptora.
- b) A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie doadora.
- c) Não entendi o experimento

Control Side	Transplant Side
	
	

54

Podemos concluir que:


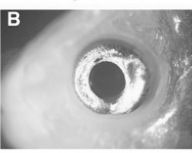


- a) A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie aceptora.
- b) A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie doadora.
- c) Não entendi o experimento

Control Side	Transplant Side
	
	

55

"A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie doadora." quer dizer que:

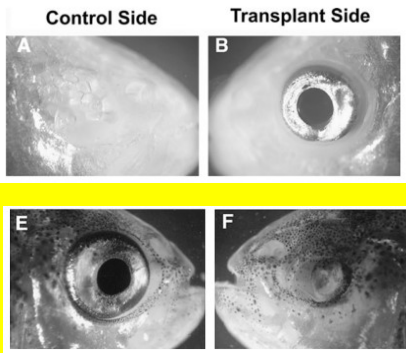
- a) O transplante influencia o tecido circundante;
- b) O tecido circundante influencia o transplante;
- c) Ninguém influencia ninguém. O transplante forma lente e retina.

Control Side	Transplant Side
	
	

56

"A lente transplantada e os tecidos em volta se desenvolvem de acordo com a espécie doadora." quer dizer que:

- a) O transplante influencia o tecido circundante;
- b) O tecido circundante influencia o transplante;
- c) Ninguém influencia ninguém. O transplante forma lente e retina.



The figure shows four panels (A, B, E, F) comparing eye development. Panels A and B are labeled 'Control Side' and 'Transplant Side' respectively. Panels E and F show a different set of comparisons. The images illustrate the interaction between the transplanted lens and the surrounding tissue.

57

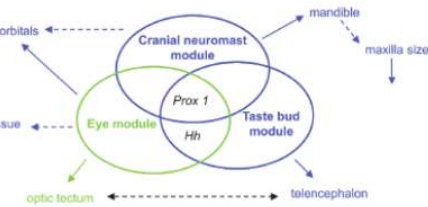
Os peixes de cavernas são anoftálmicos porque não expressam Pax6 por tempo suficiente



The figure consists of six panels (A-F). Panels A and C show whole embryos with arrows pointing to the eye region. Panels D and E are cross-sections of the eye region. Panel F shows a close-up of the eye. The text 'ailbud' is visible in panel C. The figure is sourced from 'Journal of Heredity 2005;96(3):185-196', 'Dev Genes Evol (2001) 238:138-144', and 'NATURE | VOL 431 | 14 OCTOBER 2004 |'.

58

Os peixes-cegos "optaram" por expandir o domínio de outros órgãos sensoriais em detrimento da visão



The diagram shows a Venn diagram with three overlapping circles: 'Cranial neuromast module', 'Eye module', and 'Taste bud module'. The intersection of 'Cranial neuromast module' and 'Taste bud module' is labeled 'Prox 1'. The intersection of 'Cranial neuromast module' and 'Eye module' is labeled 'Hh'. The intersection of 'Eye module' and 'Taste bud module' is labeled 'Hh'. Arrows point from these modules to various structures: 'orbitals', 'mandible', 'maxilla size', 'taste', 'optic tectum', and 'telencephalon'.

- Os peixes cegos têm Mais células sensoriais na pele
- Mais células sensoriais de odor
- Telencéfalo (odor e paladar) expandidos
- Redução do córtex visual
- Expansão da mandíbula

Franz-Ojeda, T. A. and Hall, B. K. (2006). Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evol. Dev.* 8, 94-100.
 Jeffery, W. R. (2005). Adaptive evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *J. Hered.* 96, 185-196.

59

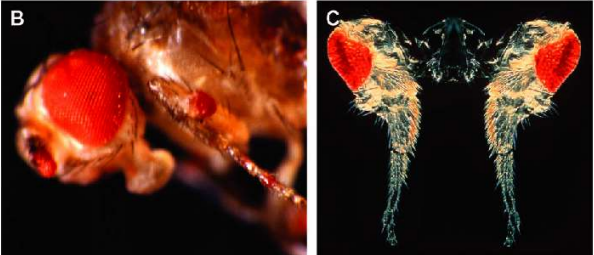
Hipótese: A presença do fator de transcrição Pax6 é SUFICIENTE para formação de olho



The image is a movie poster for 'Avengers: Endgame' featuring Thanos in the center, surrounded by other characters like Iron Man, Vision, and Wanda Maximoff. The text 'Pax6' is overlaid on the image.

60

Pax6 comanda o desenvolvimento ocular:
A expressão de Pax6 em patas cria olhos ectópicos

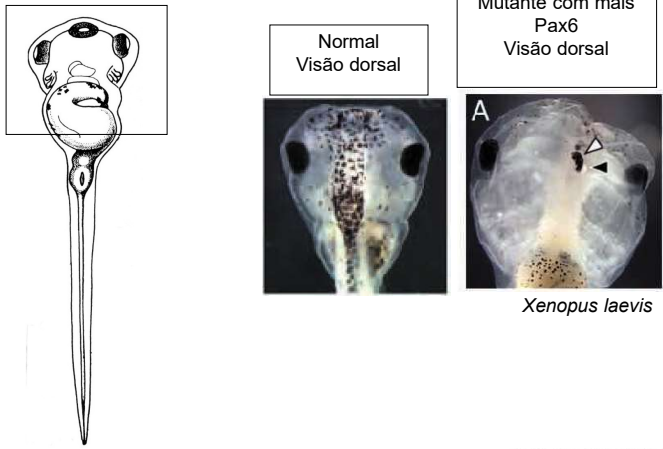


Drosophila melanogaster

Journal of Heredity 2005;96(3):171-184

61

Superexpressão de Pax6 forma de olhos extras



Normal Visão dorsal

Mutante com mais Pax6 Visão dorsal

Xenopus laevis

Development 126, 4213-4222 (1999)

62

A superexpressão de Pax6 no tronco de anfíbios forma olhos ectópicos (identificação por imuno para delta cristalina).



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 185, 119-123 (1997)

63

Conclusão: Pax 6 é necessário e suficiente para induzir formação de olho

64

Princípios Gerais

2) A presença/ativação de vias é resultado da combinação de todos os sinais recebidos

(A) COMBINATORIAL SIGNALING

65

Princípios Gerais

2) A presença/ativação de vias é resultado da combinação de todos os sinais recebidos

(A) COMBINATORIAL SIGNALING

(B) CELL MEMORY

As células quando mudam de (micro)ambiente, são expostas a sinais distintos

66

Princípios Gerais

2) A presença/ativação de vias é resultado da combinação de todos os sinais recebidos

(A) COMBINATORIAL SIGNALING

3) A transcrição é resultado da combinação dos fatores de transcrição ativos

Inactive

Inactive

Active

67

Princípios Gerais

A transcrição é resultado da combinação dos fatores de transcrição ativos E **da disponibilidade genômica**

signal

receptor

transduction

response

3

gene 1 gene 2 gene 3


regulatory modules

DEVELOPMENTAL TIME

transcription regulators

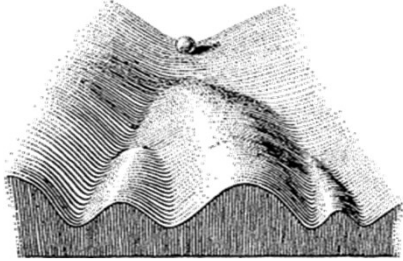
MUSCLE CELL SKIN CELL

68



Genoma humano :
 3.0×10^9 bp (3 bilhões nucleotídeos)
 18. 817 genes que codificam por proteínas

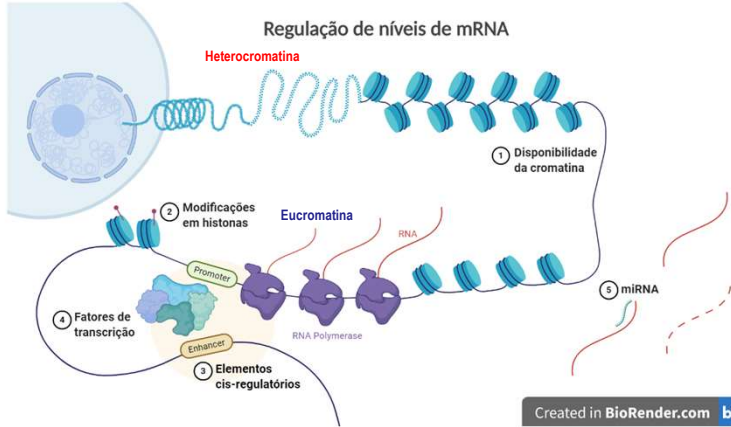
TODAS AS CÉLULAS* TÊM O MESMO GENOMA



*exceto as do sistema imune que fazem recombinação VDJ

69

Regulação de níveis de mRNA



Heterocromatina

Euromatina

- 1 Disponibilidade da cromatina
- 2 Modificações em histonas
- 3 Elementos cis-regulatórios
- 4 Fatores de transcrição
- 5 miRNA

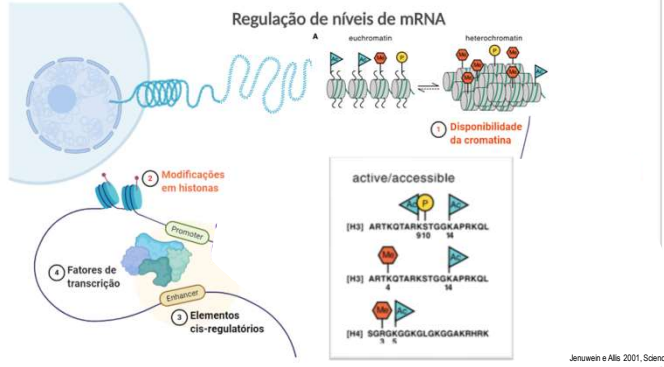
Promoter, Enhancer, RNA Polymerase, RNA

Created in BioRender.com bio

70

Elementos regulatórios (enhancers) podem ser identificados por assinaturas epigenéticas

Regulação de níveis de mRNA



active/accessible

[H3] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
 910 14

[H3] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
 1 14

[H4] SGRGGGGKGLGKGGAKRHK
 3 6

Jenuwein e Allis 2001, Science

71

Os resultados de consórcios de mapeamento epigenético estão disponíveis publicamente

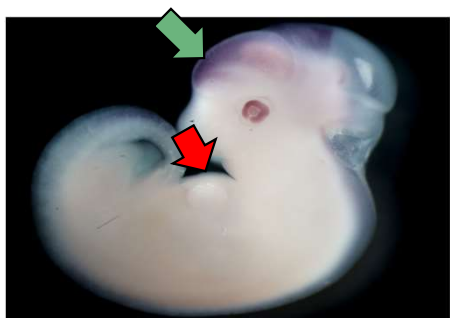
ENCODE Encyclopedia of DNA Elements

UCSC Genome Browser genome.ucsc.edu

Modification	Color	Regions	Activity Level
H3K4me3	dark blue	promoters	active, poised
H3K4me2	royal blue	promoters, enhancers	active, poised
H3K4me1	light blue	enhancers	active, poised
H3K27ac	dark green	promoters, enhancers	active
H3K9ac	light green	promoters, enhancers	active
H3K36me3	gold	exons	active
H3K27me3	dark red	introns, intergenic	repressed
H3K9me3	light red	heterochromatin	repressed

72

Pax6 é um fator de transcrição.



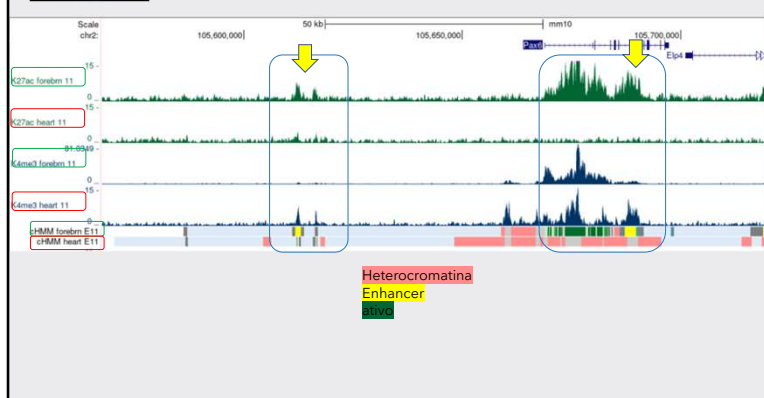
Em camudongos E11.0 está **Presente** no telencéfalo **Ausente** no coração

Hibridação in situ em embrião de camudongo

73

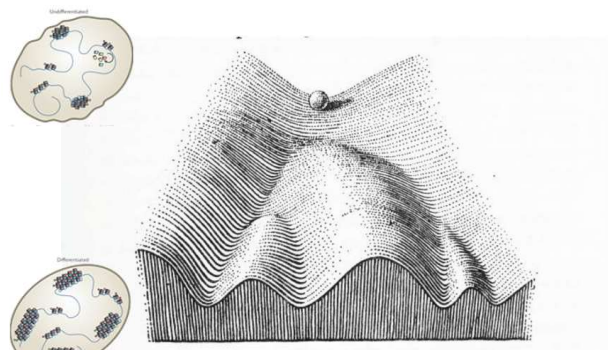
Expressão gênica Pax6

Presente no telencéfalo **Ausente** no coração



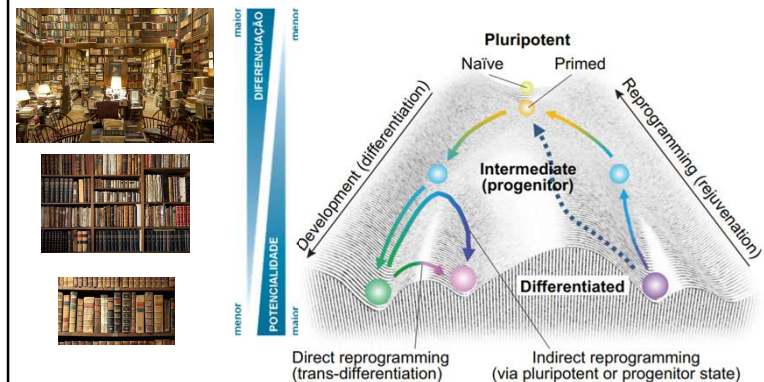
Heterocromatina
Enhancer ativo

74



Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 540-546.

75



Pluripotent Naive Primed
Intermediate (progenitor)
Differentiated

Development (differentiation)
Reprogramming (rejuvenation)

Direct reprogramming (trans-differentiation)
Indirect reprogramming (via pluripotent or progenitor state)

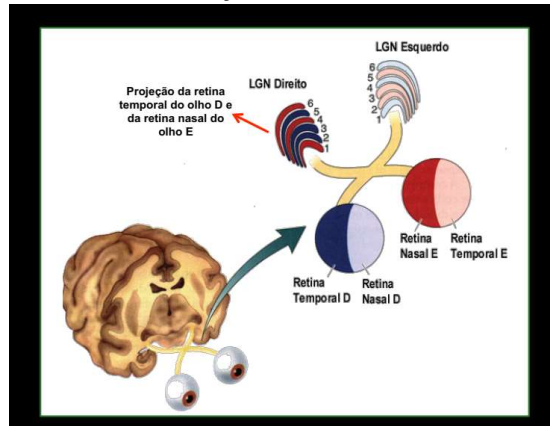
POTENCIALIDADE: maior, menor
DIFERENCIAÇÃO: maior, menor

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2015). Dev. 142, 3274-3285.

76

2) A RETINA EMITE AXÔNIOS QUE PROJETAM PARA O CÔRTEX.

COMO QUE AS PROJEÇÕES SÃO FORMADAS?



77

77

As células da retina nasal e temporal emitem axônios para o geniculato lateral

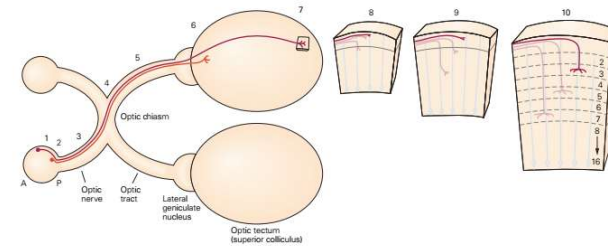
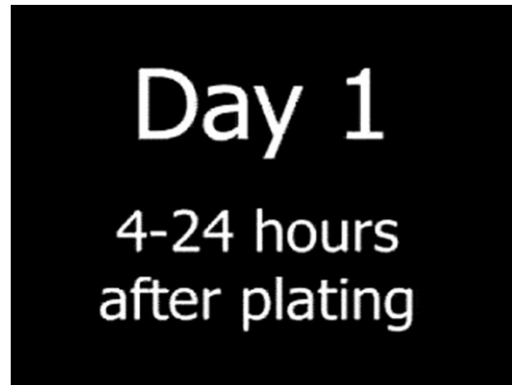


Figure 44 The path of retinal ganglion cell axons. (1) enters into the optic nerve (2) proceeds through the optic chiasm (3) passes through the optic tract (4) reaches the lateral geniculate nucleus (5) passes through the optic tract (6) reaches the lateral geniculate nucleus (7) passes through the optic tract (8) reaches the lateral geniculate nucleus (9) reaches the lateral geniculate nucleus (10) reaches the lateral geniculate nucleus

78

78

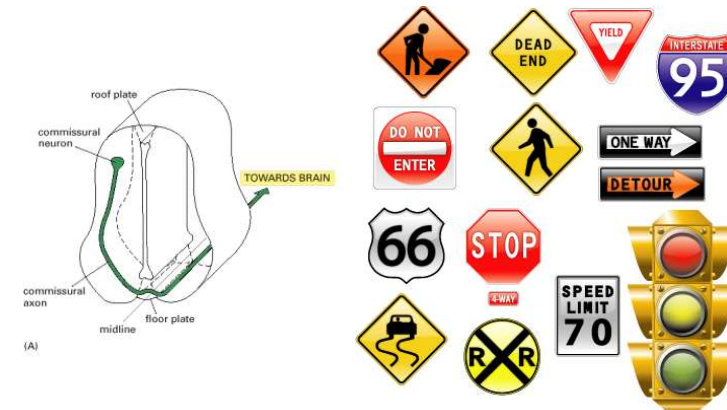
O crescimento axonal é guiado por cones de crescimento



79

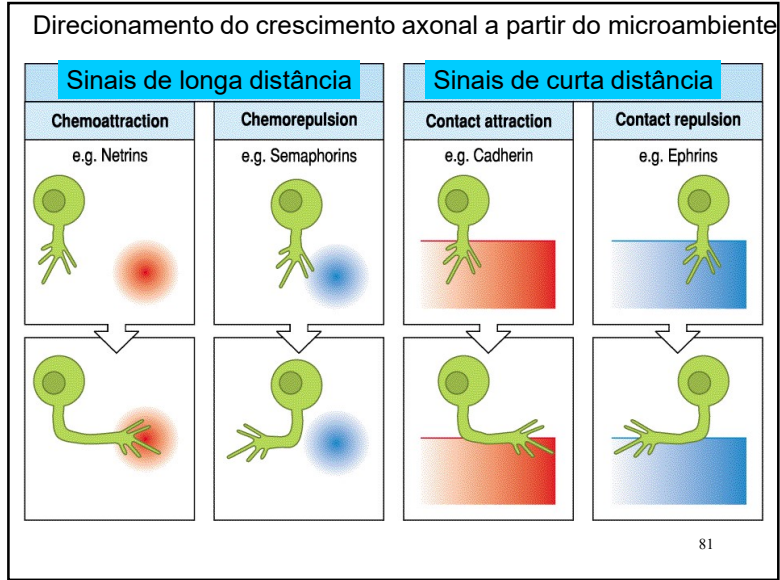
79

O caminho adotado pelo neurito depende da sinalização do microambiente

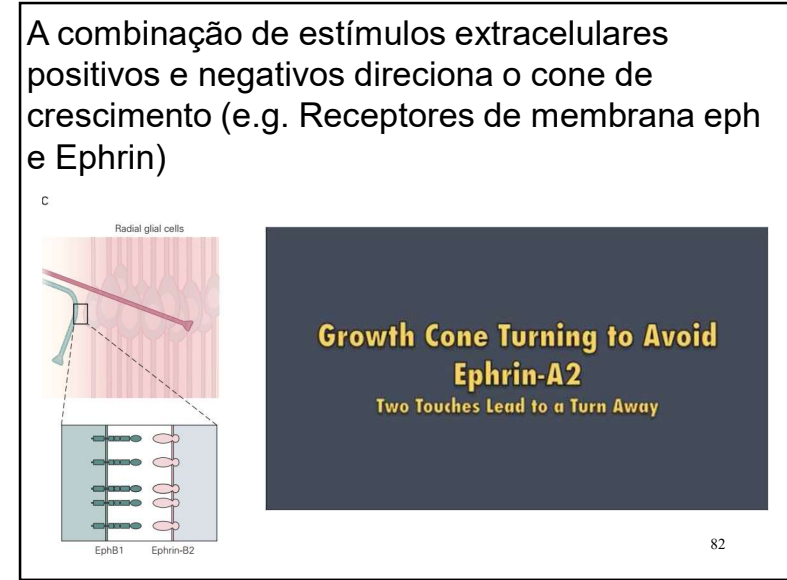


Molecular biology of the Cell, Alberts 4th Ed. 80

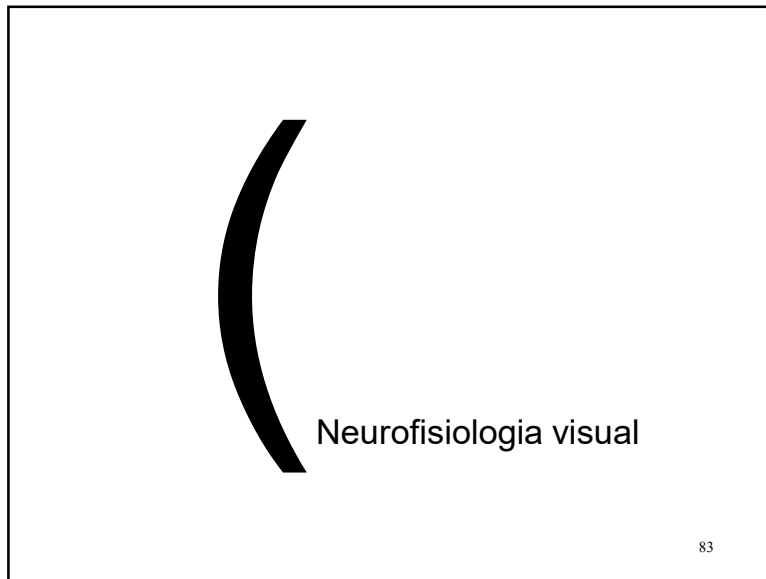
80



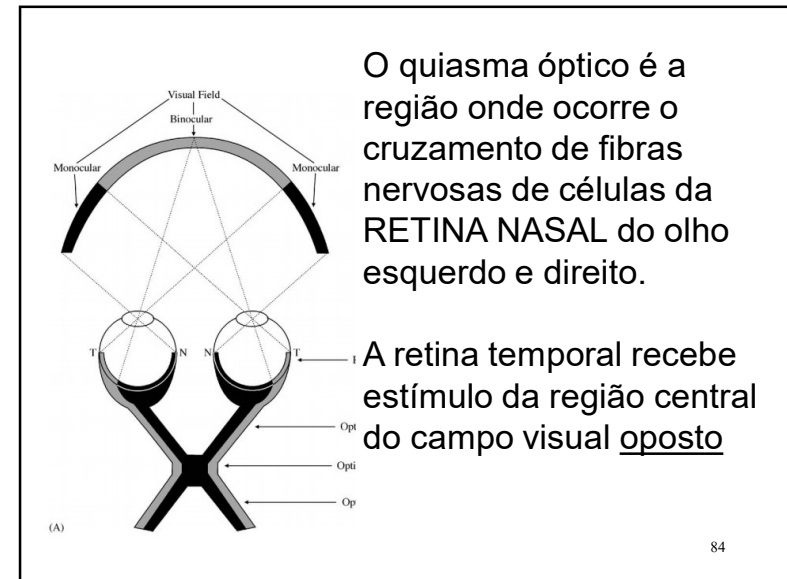
81



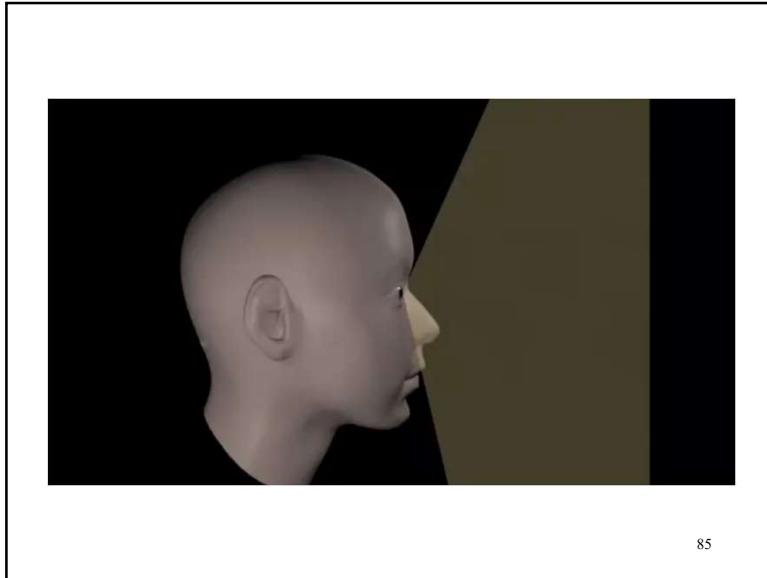
82



83



84



85

85

A posição do olho (frontal ou lateral) percentagem de fibras que cruzam no quiasma determina o tipo de campo visual.

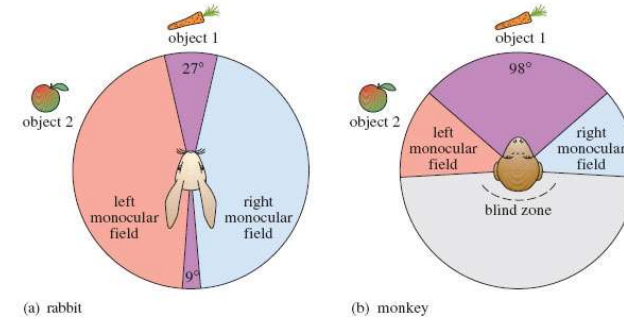
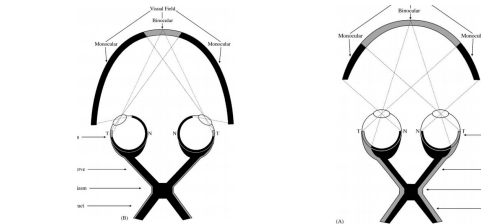
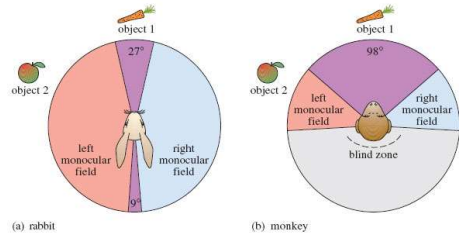


Figure 3: Bradbury, J. W. and Vehrencamp, S.L. (1998) *Principles of Animal Communication*, Sinauer Associates, Inc. ©

86

Presas necessitam de campo visual mais amplo mas menos binocularidade

Progress in Retinal and Eye Research 24 (2005) 721-753

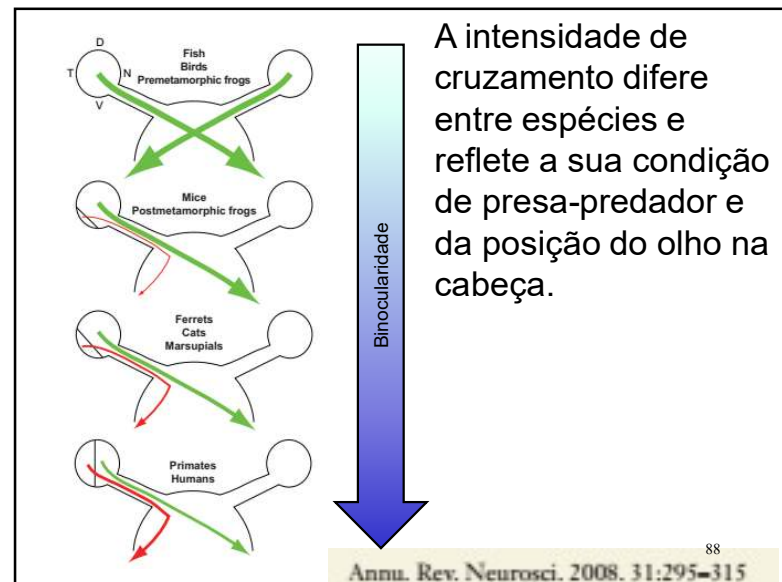


Olho lateralizado e % maior de cruzamento

Olho frontal e % menor de cruzamento

87

87

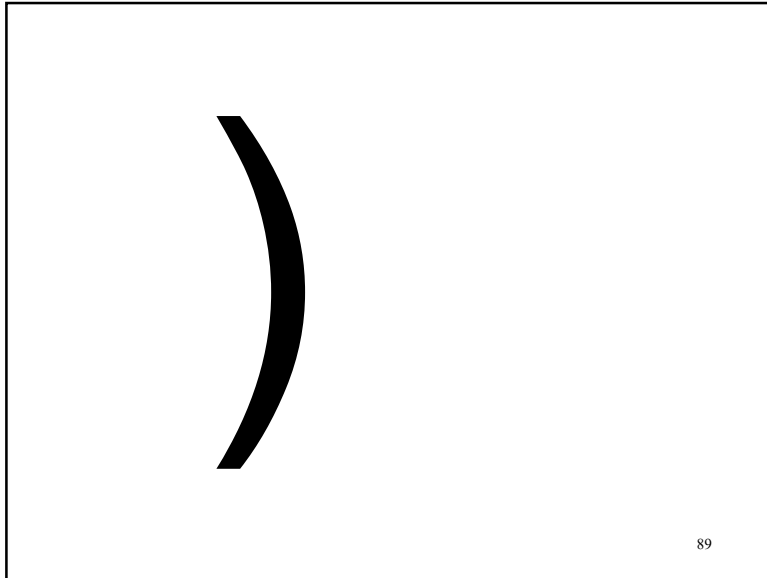


A intensidade de cruzamento difere entre espécies e reflete a sua condição de presa-predador e da posição do olho na cabeça.

Annu. Rev. Neurosci. 2008. 31:295-315

88

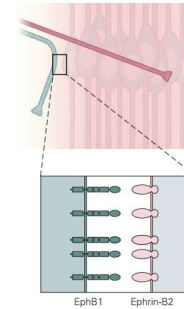
88



89

89

A interação de (ephrinB) com EphB(temporal) inicia comportamento de REPULSÃO

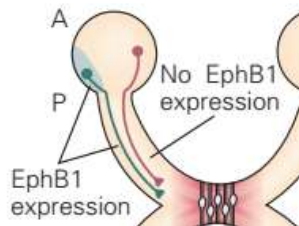


Nasal	Temporal
Sem EphB	Com EphB
Não repele	Repele

90

90

Os neurônios ganglionares retinianos expressam proteínas de membrana diferentes dependendo da sua localização

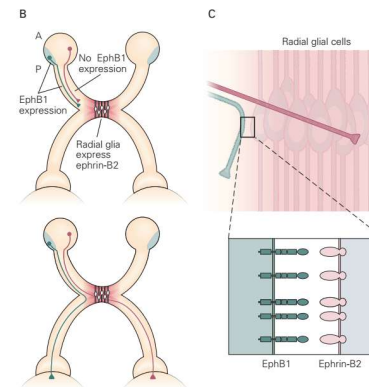


Nasal	Temporal
Sem EphB	Com EphB
Não repele	Repele

91

91

As células da glia do quiasma apresentam proteínas de membrana (ephrinB) que repelem os axônios com EphB(temporal) ipsilaterais mas não os axônios nasais



Nasal	Temporal
Sem EphB	Com EphB
Cruza	Não cruza

92

92

a. O cone de crescimento **nasais** e **temporais** chegam na região do quiasma.

b-c) os cones de crescimento contactam as membranas celulares das células da glia no quiasma

d-e) Os cones de crescimento **temporais** são repelidos enquanto os **nasais** progredem na mesma trajetória

Annu. Rev. Neurosci. 2008. 31:299-313

93

A quantidade de ephrinB no quiasma está inversamente correlacionado com a intensidade do cruzamento no quiasma

Zebrafish **Chick**

Mouse **Xenopus**

(G) EphrinB2 EphrinB

Jeffery, G. and Erskine, L. (2005). Prog. Retin. Eye Res. 24, 721-753.

94

Como ficam as projeções axonais de um camundongo que não tem EphB no genoma?

a Wild type **d EphB1^{-/-}**

Thalamus (dLGN)
Chiasm
Retina (D, T, N, V)

a) Não há mais projeções
b) Axônios nasais e temporais cruzam
c) Só cruzam os nasais
d) Só cruzam os temporais

Polleux, F., Ince-Dunn, G. and Ghosh, A. (2007). Nat. Rev. Neurosci. 8, 331-340.

95

Como ficam as projeções axonais de um camundongo que não tem EphB no genoma?

a Wild type **d EphB1^{-/-}**

Thalamus (dLGN)
Chiasm
Retina (D, T, N, V)

a) Não há mais projeções
b) Axônios nasais e temporais cruzam
c) Só cruzam os nasais
d) Só cruzam os temporais

96