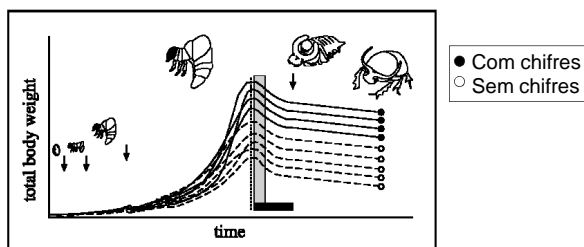
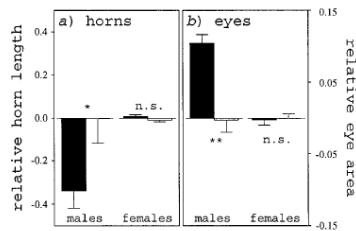


O peso larval durante o pico de JH determina a presença de chifres



May 2000 / Vol. 50 No. 5 • BioScience 403

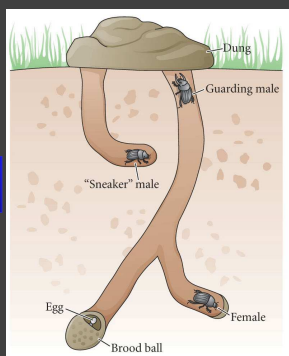
O tamanho dos chifres e dos olhos respondem de forma inversa a aplicação exógena de JH (hormônio juvenil)



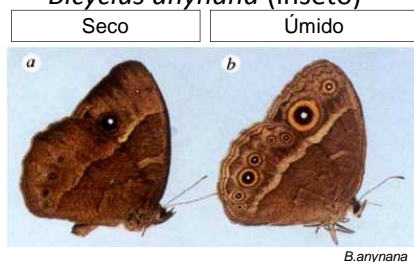
Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 95, pp. 3685-3689, March 1998
Developmental Biology, Evolution

Machos sem chifre x Machos com chifre

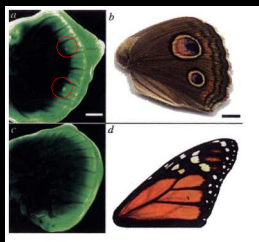
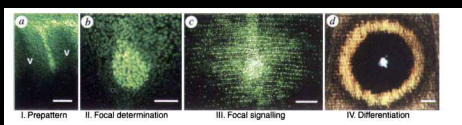


Polifenismo induzido pela temperatura
Bicyclus anynana (inseto)

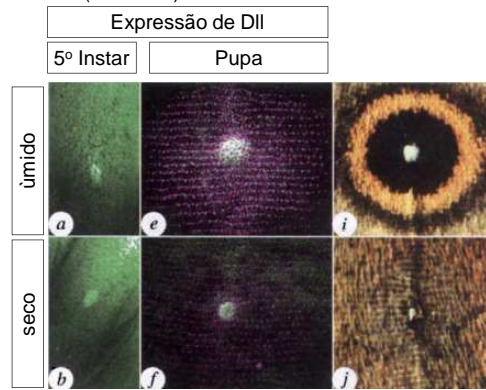


NATURE - VOL 384 - 21 NOVEMBER 1996

A posição das manchas nas asas é determinada pela expressão de Dll (Distaless)

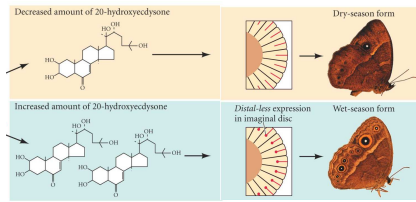


O tamanho das manchas nas asas é determinada pela expressão de Dll (Distaless)



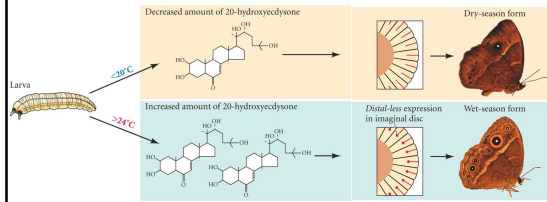
NATURE - VOL 384 - 21 NOVEMBER 1996

A quantidade de hidroxi-ecdisona presente durante a metamorfose determina o padrão de expressão de Dll (distaless)

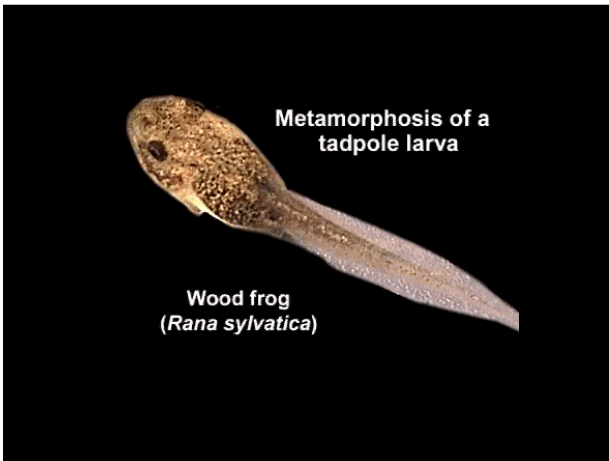


MEHLHORN, H. *Developmental Biology*, Figure 68.4 (Part 2) © 2008 Sinauer Associates, Inc.

A temperatura determina a quantidade de hidroxi-ecdisona presente durante a metamorfose

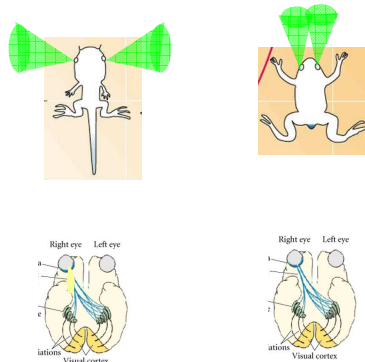


MEHLHORN, H. *Developmental Biology*, Figure 68.4 (Part 2) © 2008 Sinauer Associates, Inc.

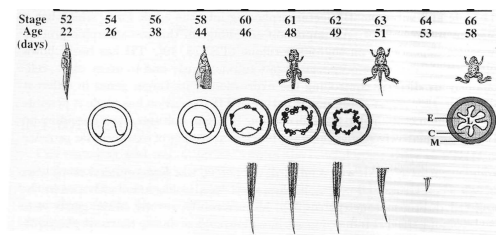


- Perda de cauda, aparecimento de membros
- Mudança do campo visual (adaptação para a dieta)
- Mudanças bioquímicas
 - Porfiropsina -> rodopsina
 - Amônia-> uréia
 - Isoforma de Hemoglobina
- Mudanças fisiológicas
 - Mudança de dieta (vegetariano para carnívoro)
 - Modo respiratório

Mudança do campo visual (adaptação para a dieta)
Aparecimento de projeções ipsilaterais

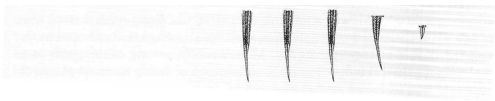


Perda de cauda, aparecimento de membros
Mudança de dieta (vegetariano para carnívoro)



<http://www.cell-research.com/1999/02/02.htm>

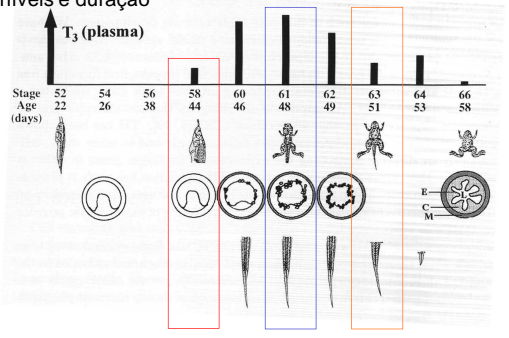
Perda de cauda



1. Cessão de síntese proteica local
2. Início de apoptose
3. Aumento de enzimas digestivas


http://www.cell-research.com/19992/992-02.htm

A metamorfose é iniciada pela T3 e coordenada pelos seus níveis e duração

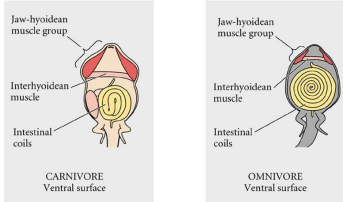


Stage	Age (days)
52	22
54	26
56	38
58	44
60	46
61	48
62	49
63	51
64	53
66	58

Neste gênero, o início e a progressão da metamorfose pode ser acelerada pelos níveis hídricos.



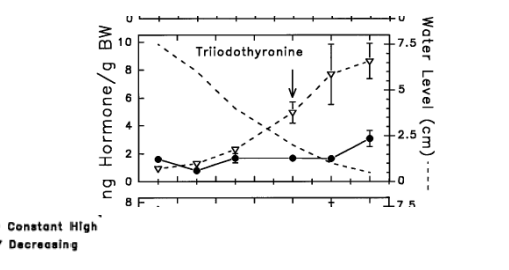
Scaphiopus couchii



Jaw-hyoidean muscle group
 Interhyoidean muscle
 Intestinal coils
 CARNIVORE Ventral surface
 OMNIVORE Ventral surface

© 2000 Steven A. Goodman, Inc.

Hormonal Correlates of Environmentally Induced Metamorphosis in the Western Spadefoot Toad, *Scaphiopus hammondi*



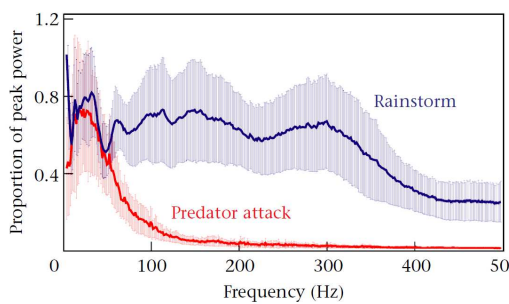
● Constant High
 ▼ Decreasing

General and Comparative Endocrinology 110, 326-336 (1998)

Polifenismo induzido por predador
Agalychnis callidryas (anfíbio)



Embrões são capazes de distinguir entre a vibração causada pelo predador ou por uma tempestade



Caldwell et al. (2010). Animal Behaviour 79:255-260.



Teratogênese:

Interferência nos mecanismos normais de embriogênese que resultam em desenvolvimento anormal ou abortivo



Esta interferência pode ser a nível SOMÁTICO e/ou GERMINATIVO



Teratogênese:

Interferência nos mecanismos normais de embriogênese que resultam em desenvolvimento anormal ou abortivo



Fatores Intrínsecos : Mutação genética

Fatores Extr nicos: **Agentes teratog nicos**

1. O genótipo do embrião determina a suscetibilidade aos agentes teratog nicos.
2. O agente teratogênico tem que ser capaz de alcançar o embrião durante a gesta o.
3. O efeito teratogênico age de forma dose-dependente.
4. PARA CAUSAR EFEITO, O AGENTE TERATOG NICO DEVE ESTAR PRESENTE DURANTE O PERÍODO SUSCETÍVEL.

Genético ou Ambiental?

D f cil diferenciar com apenas uma gesta o

Genético: mais provável em casos de *inbreeding* e/ou se limitada a uma linhagem apenas.

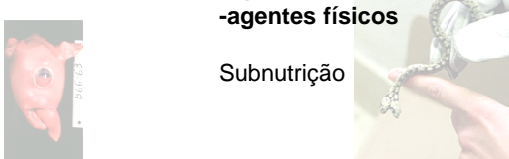
Ambiental: mais provável se afeta várias linhagens simultaneamente e se for sazonal.



Fatores Extr nicos: **Agentes teratog nicos**

- agentes químicos
- agentes infecciosos
- agentes físicos

Subnutri o



- Exemplos de Agentes Teratogênicos de origem química
-  cido retinóico
 - Talidomida
 - Cortisona
 -  lcool
 - Mercúrio
 - Chumbo
 - DDT
 - PCB
 - Cocaína
 - Hero na

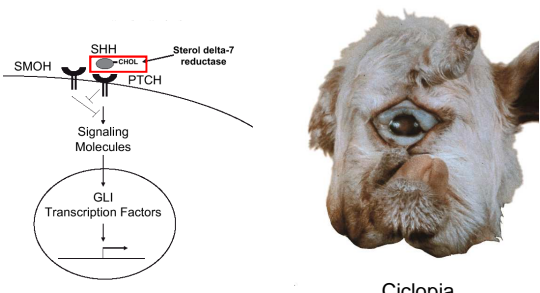
Alterações no sistema nervoso



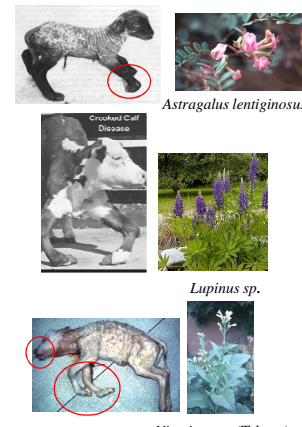
ciclopia

Veratrum californicum

Efeito teratogênico de inibidores da via metabólica do colesterol



Ciclopia



Astragalus lentiginosus

Lupinus sp.

Nicotiana sp (Tabaco)

Flexura excessiva das articulações ou tendões

Outras deformidades esqueléticas

Alterações no desenvolvimento glandular



Tireóide (gota)

Brassica sp (couve galega)

Alguns dos agentes teratogênicos podem estar presentes em fármacos agrícolas

Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses

5476-5480 | PNAS | April 16, 2002 | vol. 99 | no. 8

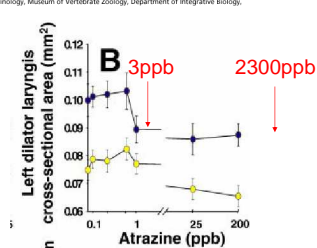
Tyrone B. Hayes*, Atif Collins, Melissa Lee, Magdalena Mendoza, Nigel Noriega, A. Ali Stuart, and Aaron Vonk

Laboratory for Integrative Studies in Amphibian Biology, Group in Endocrinology, Museum of Vertebrate Zoology, Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA 94720-3140

ATRAZINE (Aatrex®)

CN(C)C1=NC(Cl)=NC(NC(C)C)=N1

2-chloro-4(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine



Left dilator laryngis cross-sectional area (mm²)

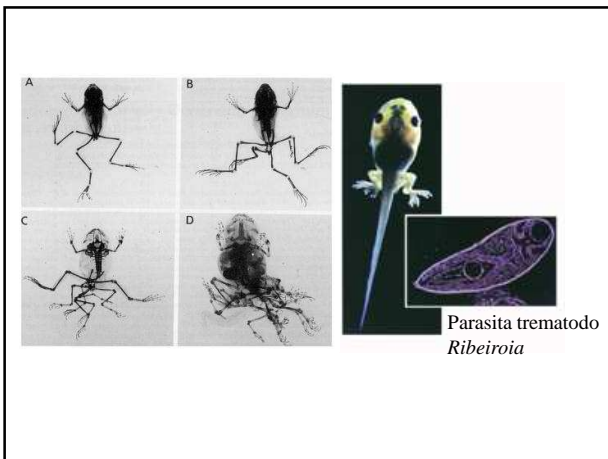
Atrazine (ppb)

3ppb

2300ppb

Exemplos de Agentes Teratogênicos Infecciosos

- Citomegalovírus
- Herpes simplex
- Parvovirus
- Rubéola
- Toxoplasma gondii* (toxoplasmose)
- Treponema pallidum* (sífilis)

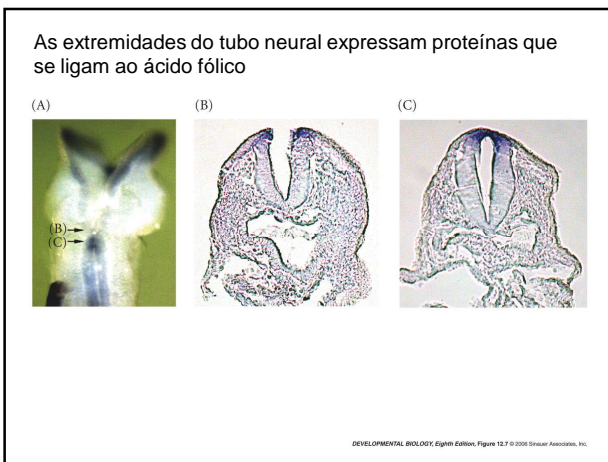


Efeitos da subnutrição

1. Deficiência em Ácido Fólico
Spina bifida (problemas no fechamento do tubo neural posterior)

2. Deficiência em Vitamina A
Defeitos visuais

http://info.ug.uidaho.edu/magazine/summer_2000/vet.html



EMBRIÕES COMO SENSORES AMBIENTAIS


1. O genótipo do embrião determina a suscetibilidade aos agentes teratogênicos.
2. O agente teratogênico tem que ser capaz de alcançar o embrião durante a gestação.
3. O efeito teratogênico age de forma dose-dependente.
4. PARA CAUSAR EFEITO, O AGENTE TERATOGENICO DEVE ESTAR PRESENTE DURANTE O PERÍODO SUSCETÍVEL.

Objetivos dos testes químicos em animais :

- Letalidade (e.g. fármacos, venenos)
- Mutagênese
- Teratogênese
- Impacto ambiental



Teste de toxicidade ideal:

- Resultados Rápidos
- Fácil interpretação
- Processamento Paralelo
- Reprodutível



Desvantagens do modelo de mamíferos para ensaios de toxicidade:

- Custo → amostragem pequena
- Duração do ensaio
- Dor

Embriões Vertebrados:

- Embriologia conservada
- Desenvolvimento externo
- Quantidade
- Custo
- Velocidade de desenvolvimento
- Controle sobre o tempo de Fertilização
- Teste indolor (SNC imaturo)





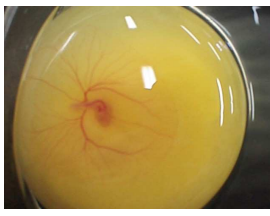
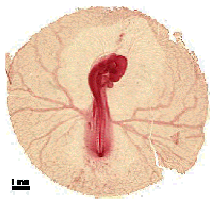


Vantagens do Embrião de galinha x mamíferos

1. Custo: R\$ 1,10 x R\$ 7,00
2. Eficiência: 6h x 24h
3. Visualização do sítio hemorrágico
4. O animal não sofre dor

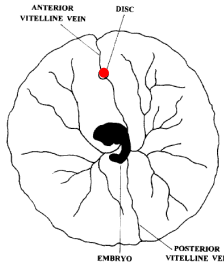
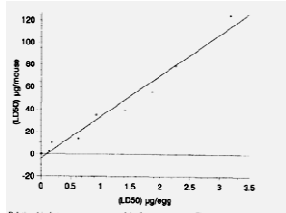
DESvantagem do Embrião de galinha x mamíferos

Não se pode testar neurotoxinas

A HUMANE ALTERNATIVE TO THE MEASUREMENT OF THE LETHAL EFFECTS (LD₅₀) OF NON-NEUROTOXIC VENOMS USING HENS' EGGS

P. G. SELLS,* P. IOANNOU and R. D. G. THEAKSTON
Alistair Reid Venom Research Unit, Liverpool School of Tropical Medicine,
Pembroke Place, Liverpool L3-5QA, U.K.

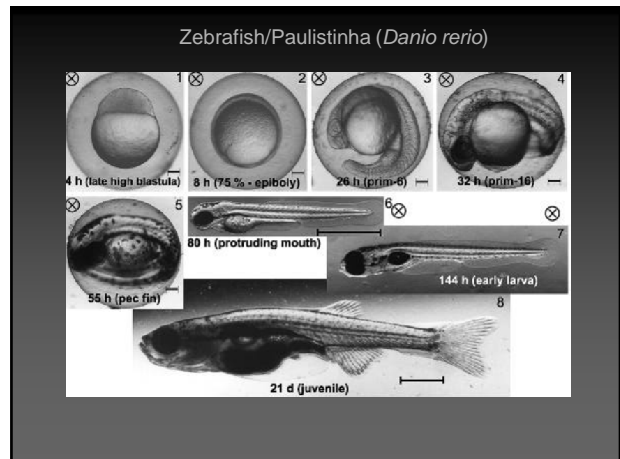
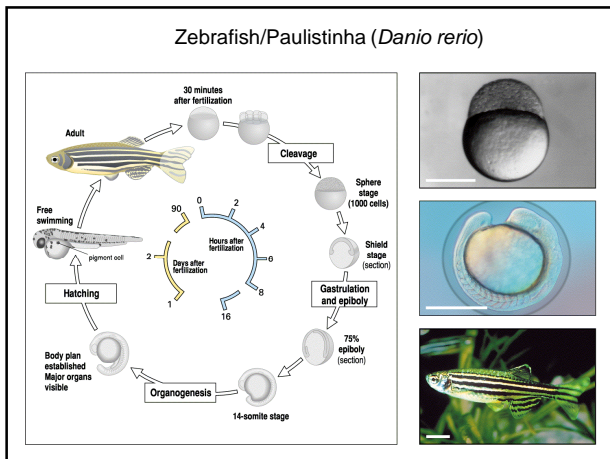
Relationship between mouse LD₅₀ and hen's egg LD₅₀. The squares and circles plotted in Table 1

Vantagens do embriões aquáticos x mamíferos

1. Custo do ensaio e da manutenção da linhagem parental
2. Eficiência: 96 h x 1 mês
3. O animal não sofre dor
4. Número de embriões para ensaio

DESvantagem do aquáticos x mamíferos

1. Treinamento de pessoal para reconhecer as malformações
2. Solubilidade do composto em meio aquoso

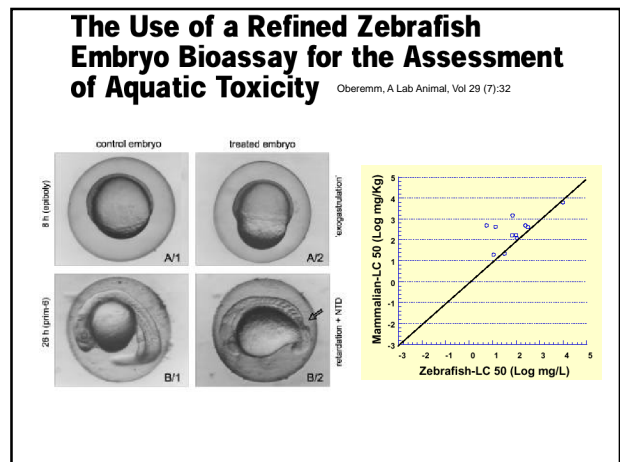


Critérios de avaliação de malformação em *Danio rerio*

TABLE 1. Steps of a zebrafish embryo test: developmental age (hours post-fertilization), developmental stage and characteristic features, and corresponding specific endpoints for evaluation (see Fig. 1 for corresponding photomicrographs).

Age (h)	Normal stage ²⁸	Features	Specific Endpoints	
4	late high blastula Fig. 1/2	elevated cap of regular small cells on top of the yolk	start of exposure	gastrulação
8	75% epiboly Fig. 1/2	late gastrula, epiboly in progression, embryo still spherical, head like embryonic shield visible	progression of ectodermal front, homogeneity of front and tissue	
24	prim-6 Fig. 1/3	basic vertebrate body organization, beginning of heart beat, melanophores in the eye, spontaneous movements	head and tail differentiation, length of tail, spontaneous movements, presence of heart beat	organogênese
32	prim-16 Fig. 1/4	blood circulatory system, melanophores spread on the trunk	heart rate, malformations of the blood circulatory system, edema, distribution of melanophores	
55	pec fin Fig. 1/5	hatching begins, melanophores pronounced, blood circulatory system fully developed	heart rate, hatching rate, malformations of the blood circulatory system, edema, state of melanophores	comportamento
80	protruding mouth Fig. 1/6	deuterostomys resting on side, still yolk present, xantophores present (embryos gleaming yellowish)	heart rate, expression of pigmentation, edema, finfold lesions	
144	early larva Fig. 1/7	body orientation upright, swim bladder inflated, swimming and feeding	orientation, swimming performance, feeding success	

Oberemm, A Lab Animal, Vol 29 (7):32



PHYLONIX

COMPANY BACKGROUND

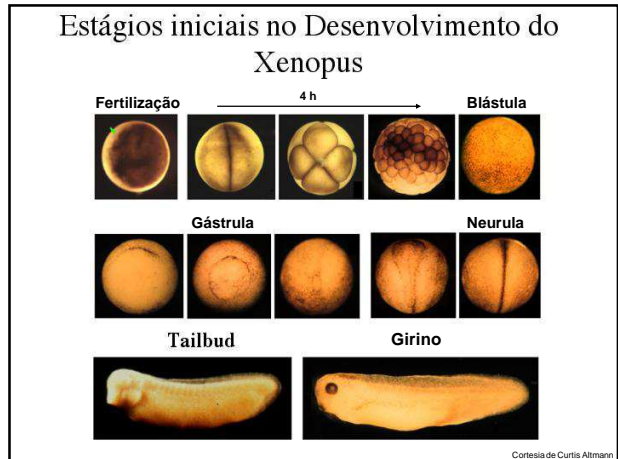
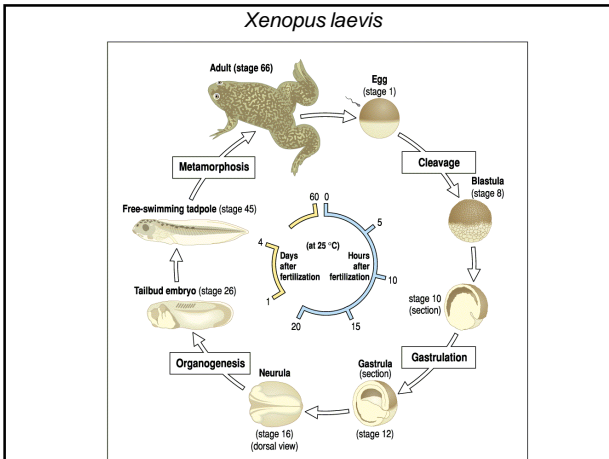
Phylonix is a Contract Research Organization developing and marketing *in vivo* zebrafish based assays for therapeutic drug screening for research and preclinical studies. The Company has established a state of the art aquaculture facility in Cambridge, MA with the capacity to produce thousands of embryos per week. Resources include automated sample handling devices, microplate readers, microscopes and flow cytometers for performing high throughput drug screens.

PLoS | November 7, 2000 | vol 5 | no 21 | 12655-12660

Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage λ cII transgene target

Richard N. Winn*, Michelle B. Norris, Kathryn J. Brayer, Cecilia Torres, and Stacy L. Muller
Warrill School of Forest Resources, University of Georgia, Athens, GA 30602

Oryzias latipes
Japanese medaka fish



<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/fetax.htm>

Background Review Document

Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX)

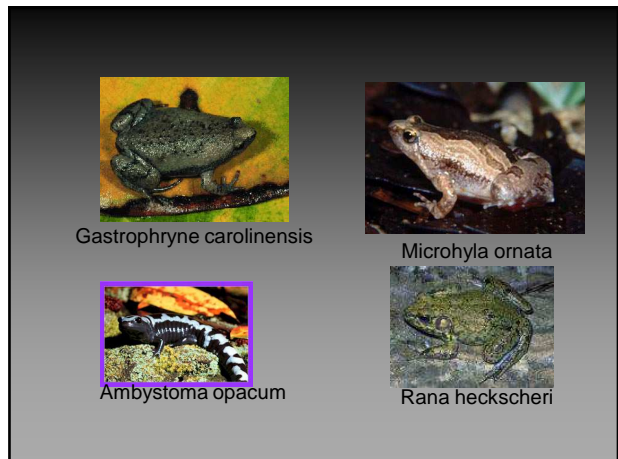
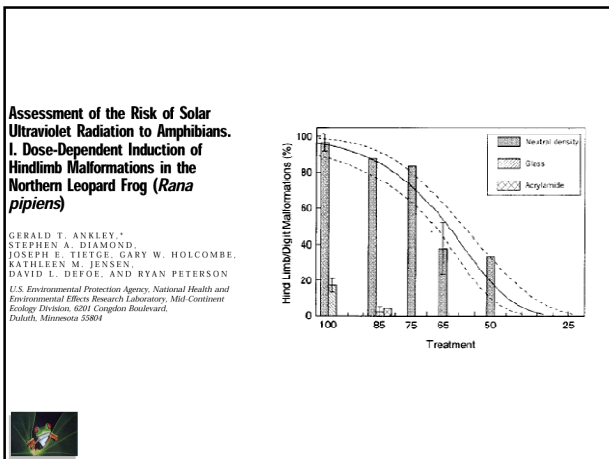
March 10, 2000

Prepared by
The National Toxicology
Program (NTP) Interagency
Center for the Evaluation of
Alternative Toxicological Methods
(NICEATM)

National Institute of Environmental Health Sciences
(NIEHS)
PO Box 12233
Mail Drop: EC-17
Research Triangle Park, NC 27709

Performance Characteristics	FETAX, with and without metabolic activation, compared to Combined Laboratory Mammal (using TI > 1.5)	FETAX, with and without metabolic activation, compared to Human (using MCI/G ₁ C ₅₀ < 0.30)	Combined Laboratory Mammal compared to Human
Accuracy	61% (55/90)*	70% (19/27)	63% (19/30)
Sensitivity	82% (41/50)	67% (8/12)	71% (10/14)
Specificity	35% (14/40)	73% (11/15)	56% (9/16)
Positive Predictivity	61% (41/67)	67% (8/12)	59% (10/17)
Negative Predictivity	61% (14/23)	73% (11/15)	69% (9/13)
False Positive Rate	65% (26/40)	27% (4/15)	44% (7/16)
False Negative Rate	18% (9/50)	33% (4/12)	29% (4/14)

*Numbers in parenthesis indicate the number of accurate results/total number of substances compared.



NO BRASIL, OS ANFÍBIOS ANUROS SÃO CERCA DE

- 800 espécies conhecidas
- 7 famílias

<http://www.herpetofauna.brp.br.com.br/Portar/Artigos.htm>

O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO é um processo contínuo que refina a identidade celular a cada passo.

1. O processo de diferenciação é uma série de decisões

O processo de DESdiferenciação requer "gasto energético"

Developmental potential

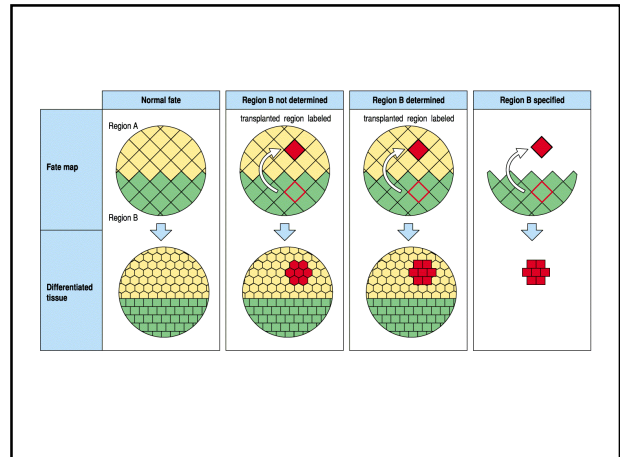
- Totipotent**
Zygote
- Pluripotent**
ICM/ES cells, EG cells, EC cells, mGS cells, IPS cells
- Multipotent**
Adult stem cells (partially reprogrammed cells?)
- Unipotent**
Differentiated cell types

2. A influência materna é essencial para as decisões

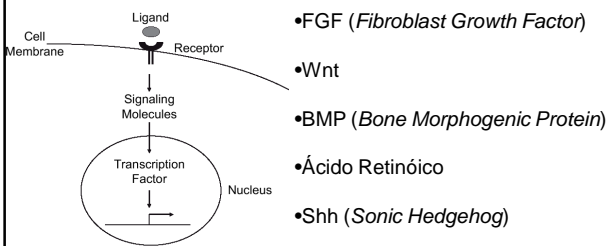
Spemann, 1938

Pergunta: O ovo recém-fertilizado tem sua potencialidade distribuída simetricamente?

3. A influência do microambiente também é essencial para as decisões



Durante a embriogênese existem vários TIPOS de LIGANTES EXTRACELULARES



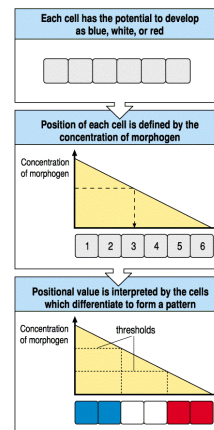
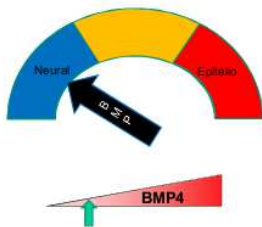
Pediatr Clin N Am
53 (2006) 855-871

4. A mesma molécula/via de sinalização pode ter efeitos diferentes dependendo da concentração e do contexto.

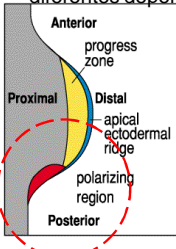




4. A mesma molécula/via de sinalização pode ter efeitos diferentes dependendo da **concentração** e do contexto.

O ectoderma exposto a baixos níveis de BMP = Neural



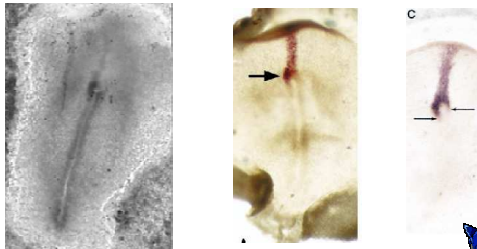


4. A mesma molécula/via de sinalização pode ter efeitos diferentes dependendo da concentração e do **contexto**.

O Shh (Sonic Hedgehog) é expresso na Região Polarizadora


Shh: Proteína secretada no meio extracelular

O Shh é assimetricamente expresso no Nó de Hensen

sobre síndromes...

Síndromes = Efeito Eddie Murphy



O Shh é produzido na **notocorda**, **tubo digestório** e broto do membro



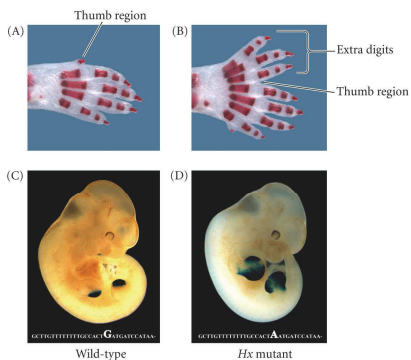
DEVELOPMENTAL BIOLOGY: Fifth Edition, Figure 15.11 © 2001 Sinauer Associates, Inc.

Camundongos com deleção para o gene Shh carecem de motoneurônios e **apresentam anomalias do S. Nerv. Central, dos membros e do sist. Digestório**

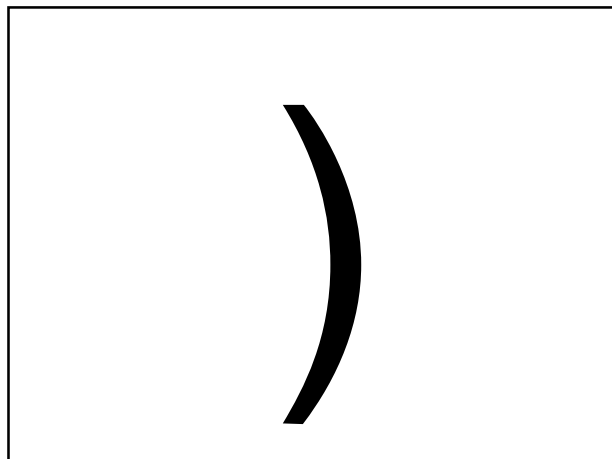
	Normal	Mutante
		
Deteção de motoneurônio		

Nature 412, 194-198 (12 July 2001)

Camundongos com EXCESSO do gene *Shh* apresentam polidactilia



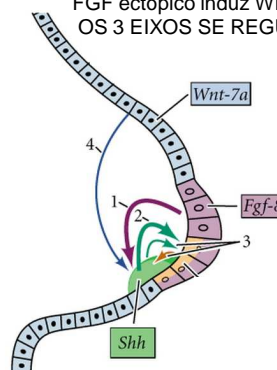
DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 16.17 © 2005 Sinauer Associates, Inc.



5. Uma via de sinalização não é suficiente para controlar um evento completo.



FGF ectópico induz *Wnt7a*; OS 3 EIXOS SE REGULAM ENTRE SI



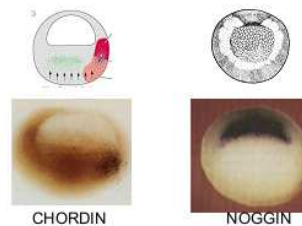
© 2005 Sinauer Associates, Inc.

6. Redundância é importante



Belt and suspenders

Existem INIBIDORES de BMP4 no ORGANIZADOR



7. Investigação dos mecanismos moleculares que geram estruturas HOMÓLOGAS permitem a compreensão da Evolução.



O morcego é um camudongo que voa?



8. A MODULARIDADE do desenvolvimento permite a alteração de algumas estruturas sem afetar o todo.



Pitx1 modular enhancer in 3-spined sticklebacks

http://www.biocel.icb.usp.br/~ireneyan/EMBRILOGIAMOLECULAR_arquivos/aulas/ln%20silico.htm

