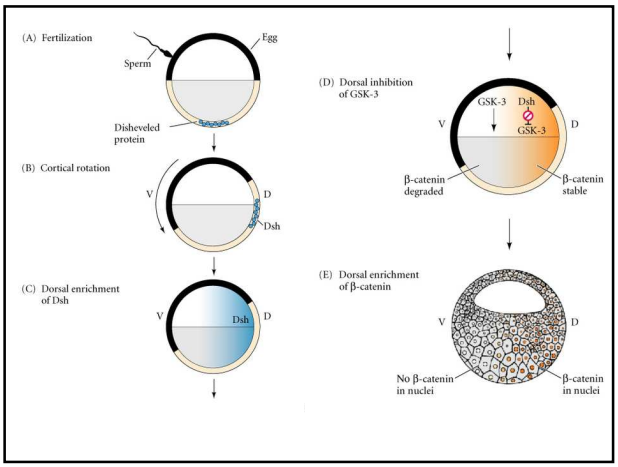
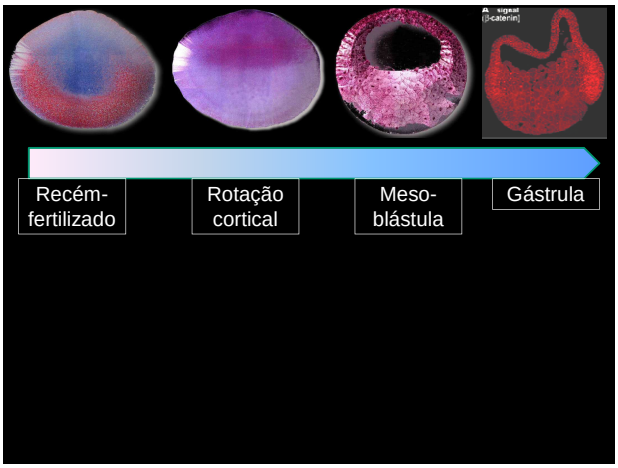
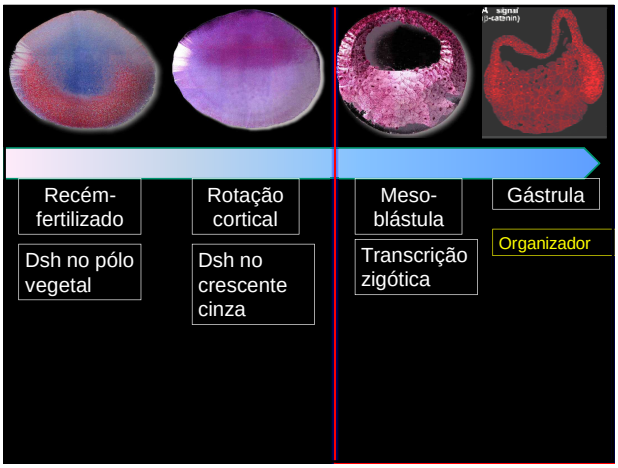
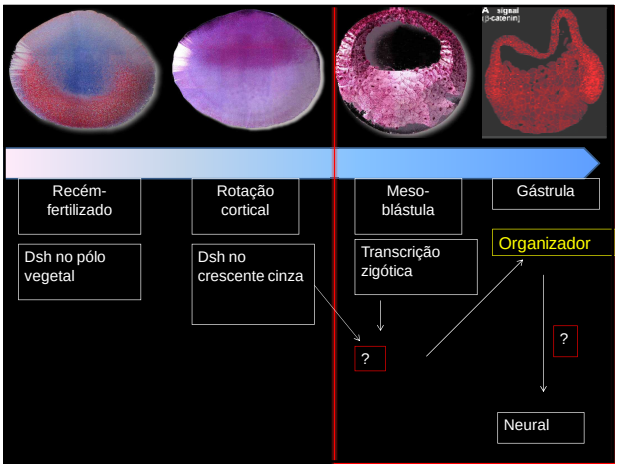
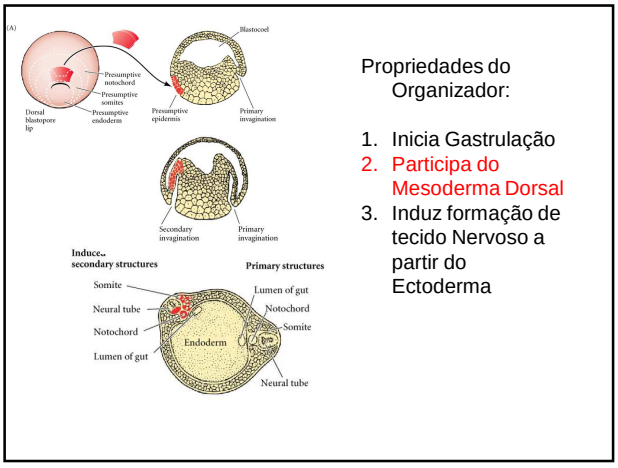






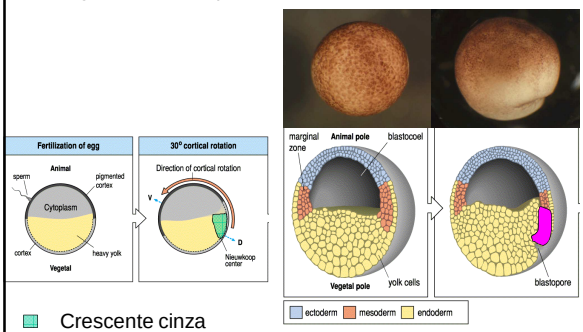




Propriedades do Organizador:

1. Inicia Gastrulação
2. Participa do Mesoderma Dorsal
3. Induz formação de tecido Nervoso a partir do Ectoderma

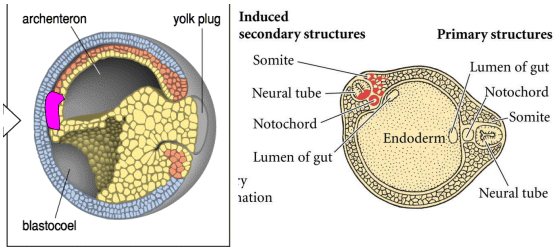
O Organizador de Spemann fica no MESODERMA DORSAL



Crescente cinza

Organizador de Spemann

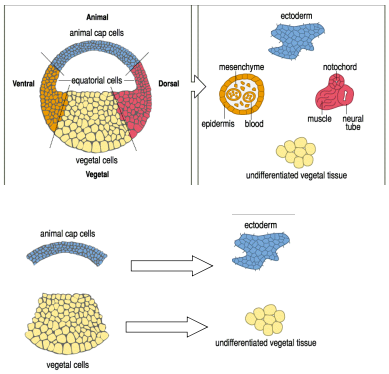
Após a gastrulação, as células do Organizador irão formar a notocorda



QUAL É A RELAÇÃO ENTRE

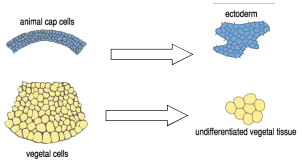
O CRESCENTE CINZA, BETA-CATENINA E O MESODERMA DORSAL???!!

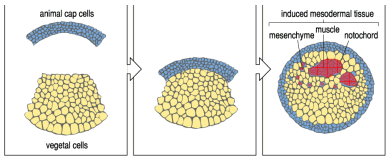
Como é formado o MESODERMA?



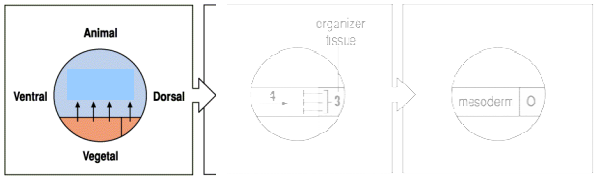
Nieuwkoop, anos 70

O pólo vegetal contêm elementos que induzem o mesoderma mesmo antes da transcrição zigótica.





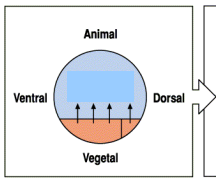
Hipótese: Existem fatores no pólo vegetal que induzem o Mesoderma



Um gene candidato a indutor endógeno do Organizador deve ter a seguintes propriedades:

1. Expressão na região dorsal
2. Capaz de causar duplicação axial
3. Capaz de compensar pelo efeito do UV
4. Ser de origem materna

Hipótese: Existem fatores no pólo vegetal que induzem o Mesoderma



Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

?

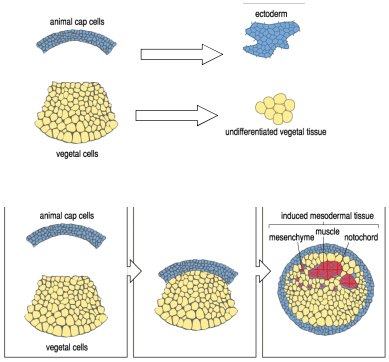
Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

1. Propriedade Molecular?
2. Expressão Espacial?
3. Expressão Temporal?

Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

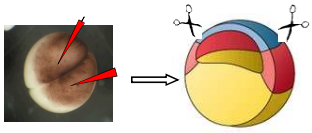
1. Capaz de induzir MESODERMA
2. Expresso no pólo vegetal
3. Ser de origem materna

Teste para indução de Mesoderma



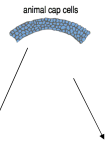
Teste para indução de Mesoderma

Explantes de ectoderma

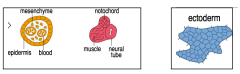


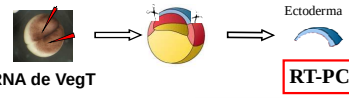
Microinjeção de RNA
(estágio de 2 células)

Microcirurgia
(Blástula)



RT-PCR



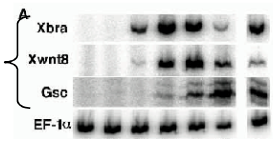


RNA de VegT

Ectoderma

RT-PCR

Genes de Mesoderma



Mesoderma

Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

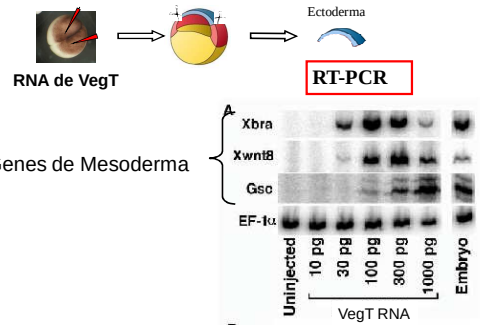
1. Capaz de induzir MESODERMA
2. Expresso no pólo vegetal
3. Ser de origem materna

Membros da família

FGF (ex. eFGF, bFGF)

TGF-beta (Xnr1,Xnr2,Vg1, VegT)

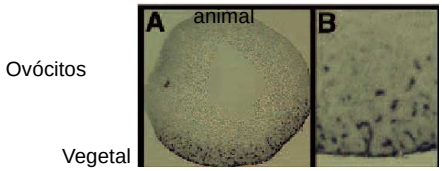
O VegT é um candidato a fator endógeno indutor do mesoderma ?



Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

1. ☑ Capaz de induzir MESODERMA
2. Expresso no pólo vegetal
3. Ser de origem materna

O VegT é um candidato a fator endógeno indutor do mesoderma ?

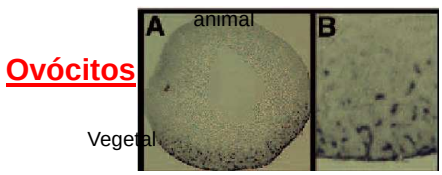


Hibridação in situ para mRNA de VegT

Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

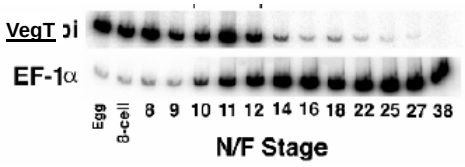
1. ☑ Capaz de induzir MESODERMA
2. ☑ Expresso no pólo vegetal
3. Ser de origem materna

O VegT é um candidato a fator endógeno indutor do mesoderma ?



O VegT é um candidato a fator endógeno indutor do mesoderma

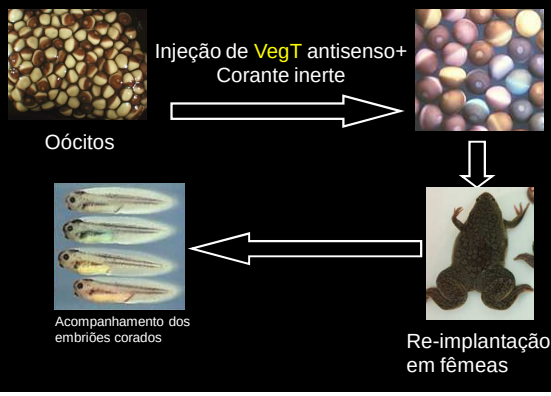
Ele é expresso maternalmente



Um gene candidato a indutor endógeno do MESODERMA deve ter a seguintes propriedades:

- ☑ 1. Capaz de induzir MESODERMA
- ☑ 2. Expresso no pólo vegetal
- ☑ 3. Ser de origem materna

O método de antisenso em oócitos para interferir com genes maternos

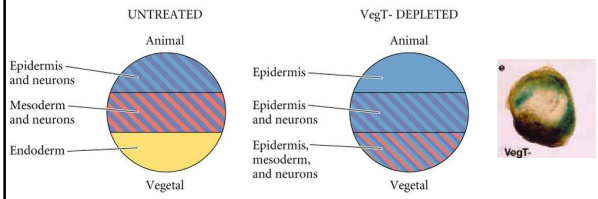


Normal

Sem VegT maternal
(tratado com antisenso)

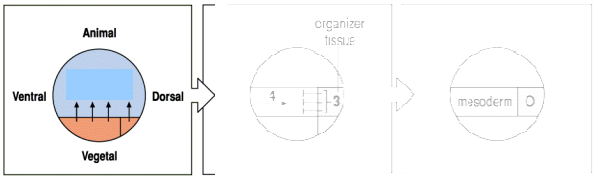
Kofron et al.
Development 126, 5759-5770 (1999)

A depleção de VegT materno altera a disposição dos folhetos embrionários, eliminado quase completamente o Mesoderma



Zhang et al
Cell, Vol. 94, 515–524, August 21, 1998.

Hipótese: Existem fatores no pólo vegetal que induzem o Mesoderma



VegT

Sem VegT maternal
(tratado com antisenso)

Ventralizante

• U.V.
•Ausência de Crescente Cinza

Dorsalizante
ou
Duplicação axial

•Transplante de Spemman

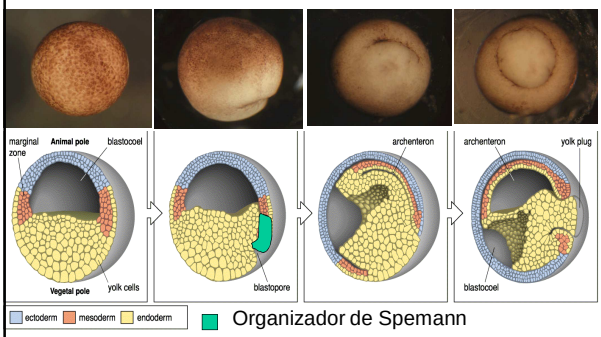
Ventralizante

• U.V.
•Ausência de Crescente Cinza
•**Ausência de VegT**

Dorsalizante
ou
Duplicação axial

•Transplante de Spemman
•**Wnt**

O Organizador de Spemann fica no **MESODERMA DORSAL**

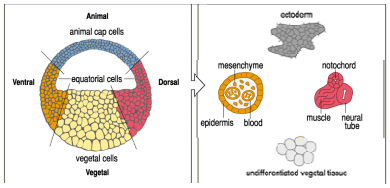


Organizador de Spemann

Experimentos Clássicos

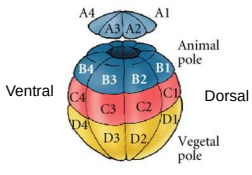
•Centro de Nieuwkoop

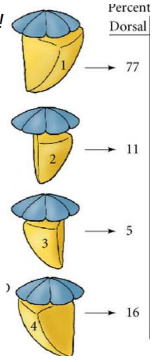
Como é formado o MESODERMA DORSAL?



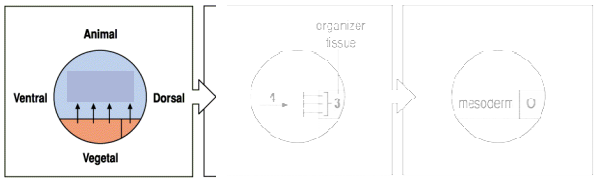
Dale and Slack, 1987
A região dorsal do pólo vegetal é capaz de induzir mesoderma **DORSAL**

NASCE O *CENTRO DE NIUWKOOP!*



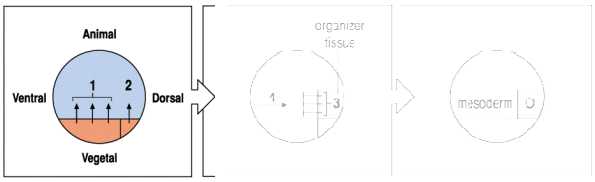


Hipótese: Existem fatores no pólo vegetal que induzem o Mesoderma



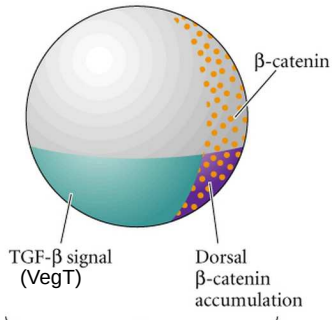
VegT

Hipótese: Existem fatores no pólo vegetal DORSAL que induzem o Mesoderma DORSAL

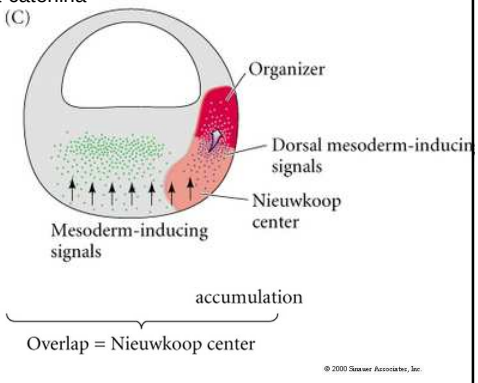


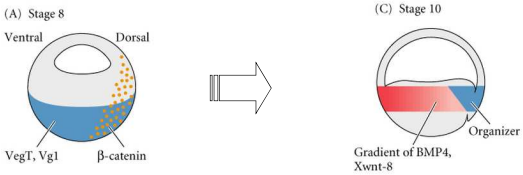
VegT

Que elemento materno está na região dorsal ?



O Centro de Nieuwkoop é formado pela sobreposição de VegT e Beta-catenina

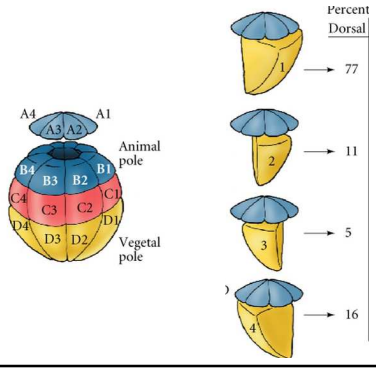




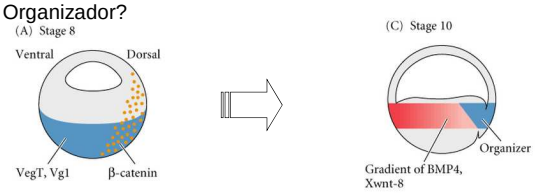
β-catenina → Mesoderma Dorsal

VegT e outros TGF-betas → Mesoderma Ventral

Mas VegT e beta-catenina são fatores de transcrição!!!

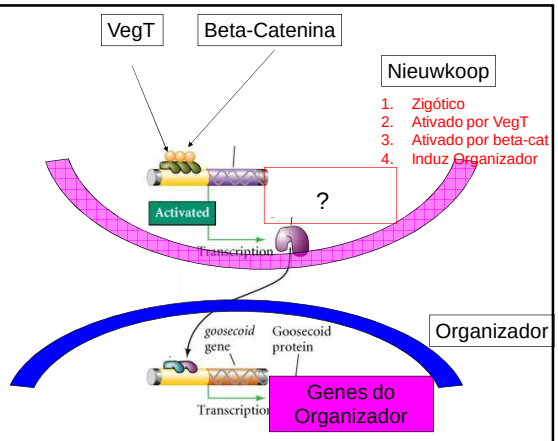


O que é **secretado** pelo Centro de Nieuwkoop para formar o Organizador?

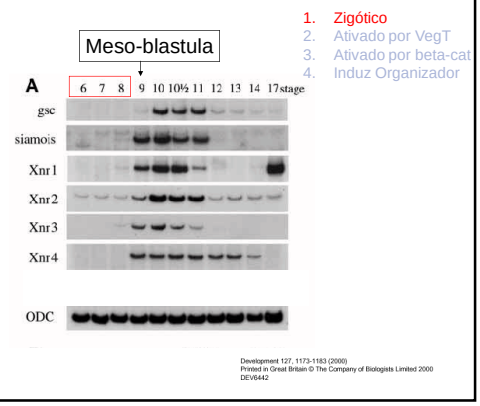


β-catenina → Nieuwkoop ? → Mesoderma Dorsal (Org)

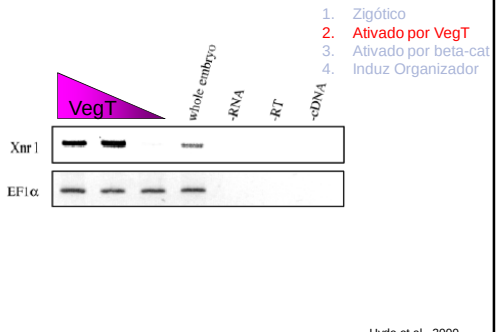
VegT e outros TGF-betas → ? → Mesoderma Ventral



Xnrs são expressos zigóticamente

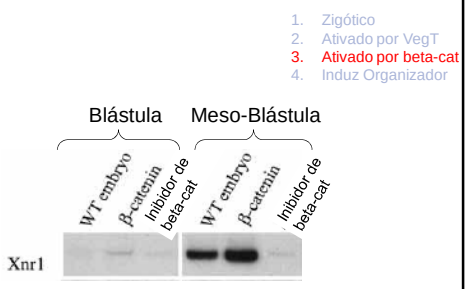


O VegT induz a expressão de Xnr1



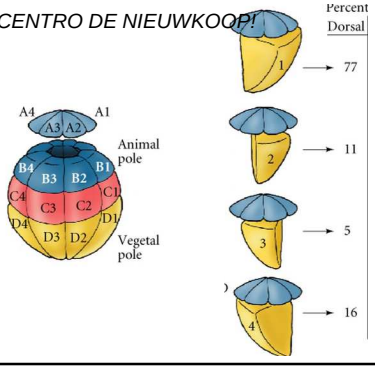
Hyde et al., 2000

A atividade de Beta-catenina é necessária para expressão de Xnr1

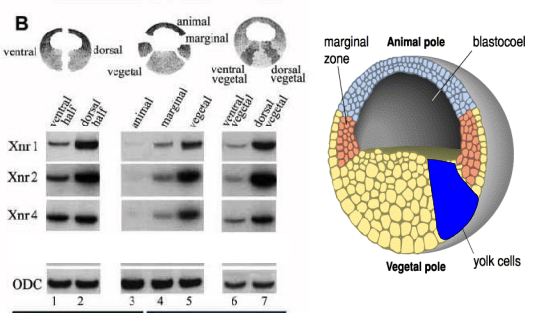


Dale and Slack, 1987
A região **dorsal do pólo vegetal** é capaz de formar mesoderma **DORSAL**

NASCE O *CENTRO DE NIEUWKOOP!*



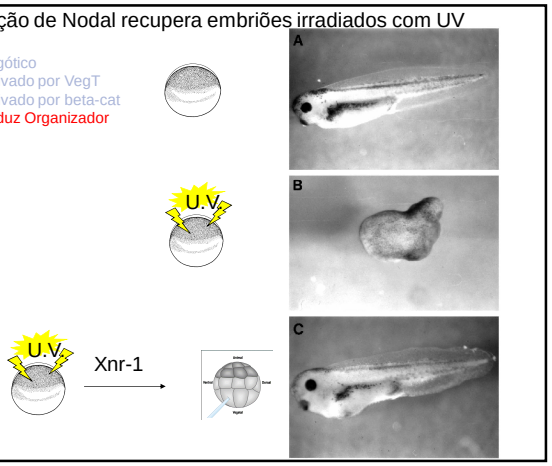
A região **dorsal do pólo vegetal** é enriquecida em Xnr1



Xnr1/2/4

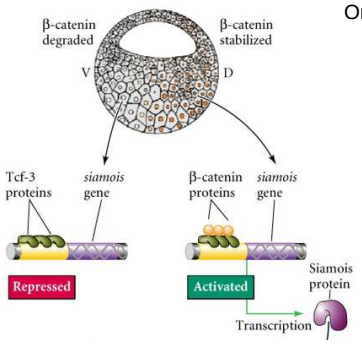
Injeção de Nodal recupera embriões irradiados com UV

1. Zigótico
2. Ativado por VegT
3. Ativado por beta-cat
4. Induz Organizador

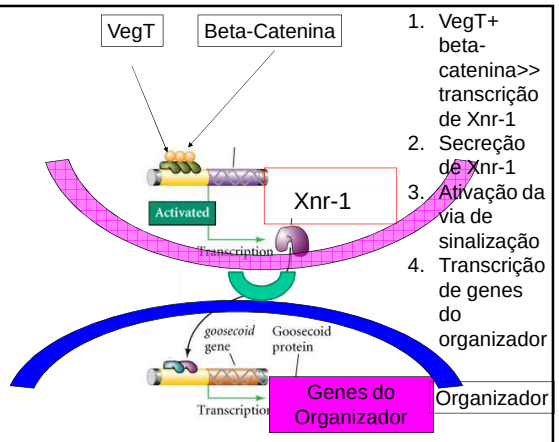


Mais complexo...

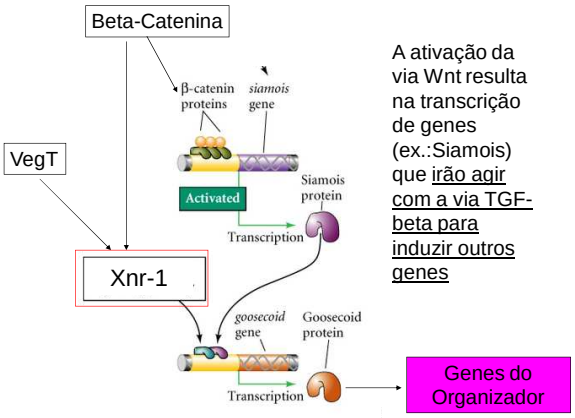
O efeito cascata no Organizador



A ativação da via Wnt resulta na transcrição de genes na região dorsal (ex.:Siamois)

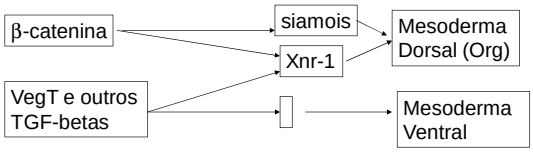


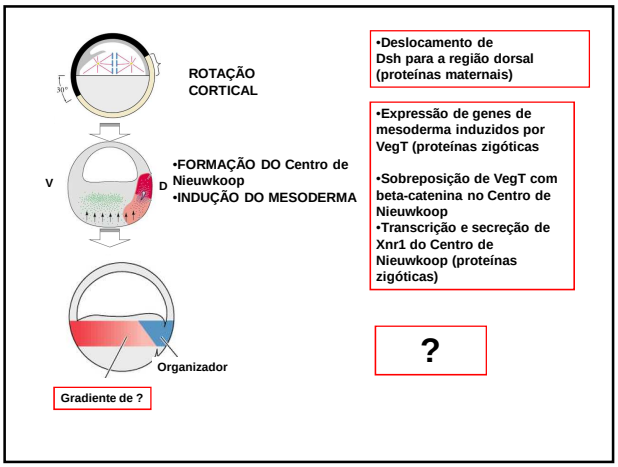
1. VegT+ beta-catenina>> transcrição de Xnr-1
2. Secreção de Xnr-1
3. Ativação da via de sinalização
4. Transcrição de genes do organizador

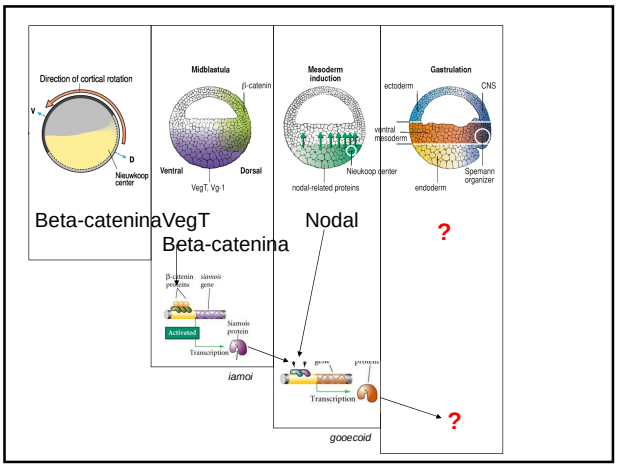


A ativação da via Wnt resulta na transcrição de genes (ex.:Siamois) que <u>irão agir com a via TGF-beta para induzir outros genes</u>

Nieuwkoop

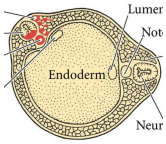


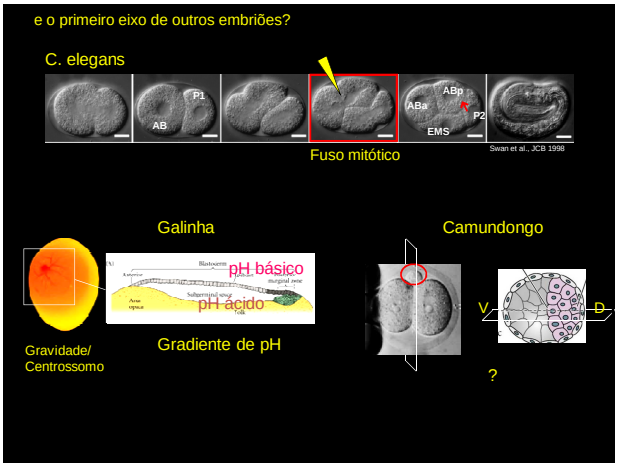


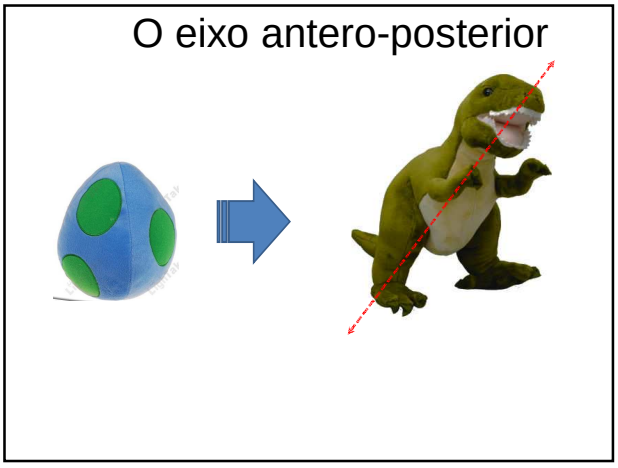


Propriedades do Organizador:

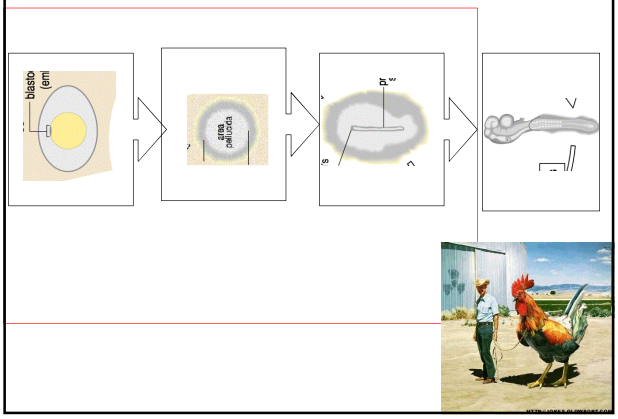
1. Inicia Gastrulação
2. Participa do Mesoderma Dorsal
3. Induz formação de tecido Nervoso a partir do Ectoderma







O primeiro eixo a ser definido no embrião de **galinha é o antero-posterior**

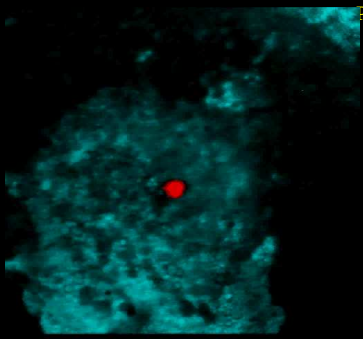


ONDE se inicia a gastrulação em *Gallus gallus?*

Como seguir uma célula entre várias?

A injeção de corante flourescente permite acompanhar o destino celular

Gilbert 8th Edition



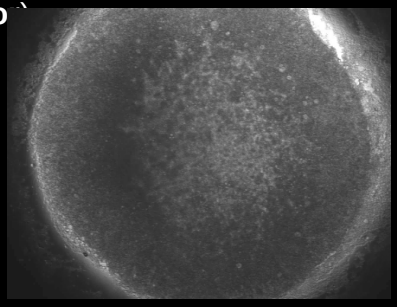
Posterior

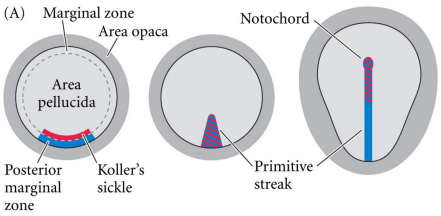
Anterior

A LINHA PRIMITIVA surge de uma região logo anterior a um crescente (Foice de Koller) que define a PMZ (Zona Marginal Posterior)

Timelapse: Formation of the Primitive Streak and Early Neural Tube

A LINHA PRIMITIVA surge de uma região logo anterior a um crescente (Foice de Koller) que define a PMZ (Zona Marginal **Posterio**

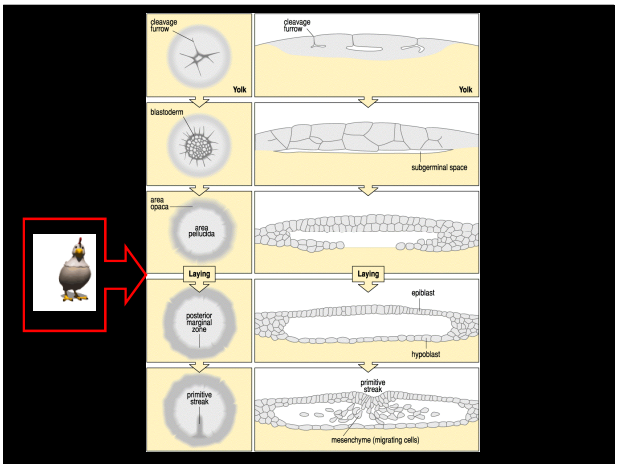


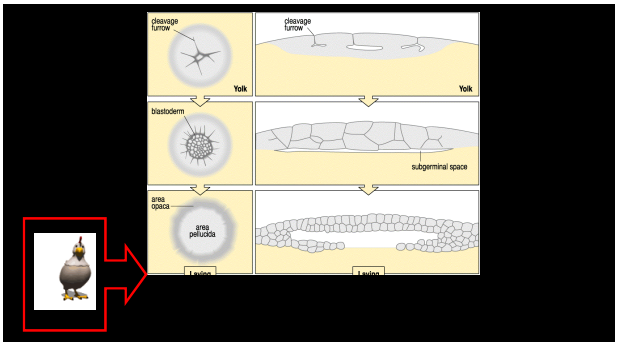


Foice de Koller

Linha Primitiva

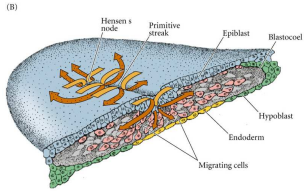
O QUE é Zona Marginal Posterior (PMZ)?



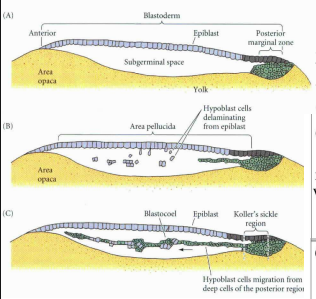


onde se inicia a linha primitiva?

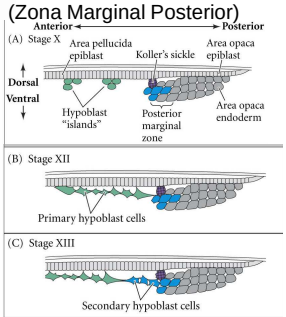
As células que ingressam pela linha primitiva têm dois destinos:
Espaço entre **Epi e Hipoblasto**
Deslocam e substituem o Hipoblasto secundário, formando o endoderma definitivo

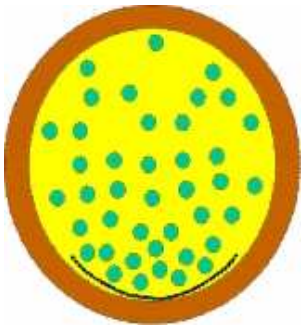


O HIPOBLASTO é formado em duas etapas:

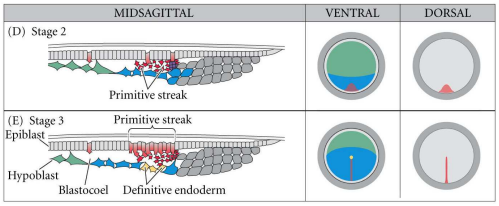


1. Delaminação do Hipoblasto Primário
2. Migração do Hipoblasto Secundário a partir da PMZ (Zona Marginal Posterior)





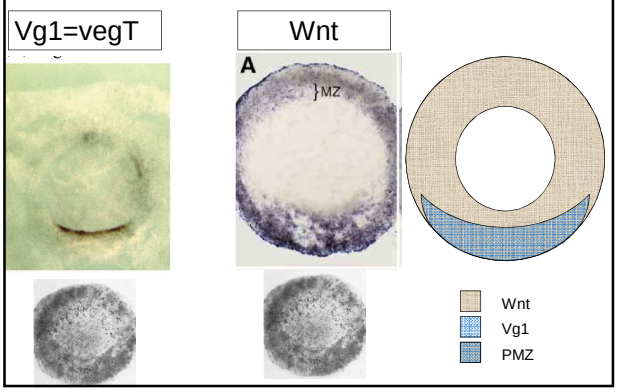
A LINHA PRIMITIVA surge de uma região logo anterior à PMZ



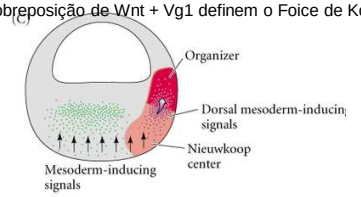
O QUE DEFINE ONDE SERÁ FORMADO a zona marginal POSTERIOR?

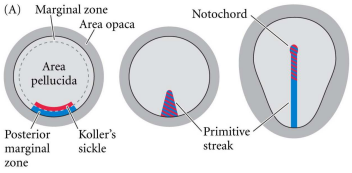
A PMZ expressa Vg (= VgT)

A região marginal toda expressa Wnt



No Xenopus, a sobreposição da via de Wnt + VegT forma o Centro de Nieuwkopp
Na ave, a sobreposição de Wnt + Vg1 definem o Foice de Koller na PMZ

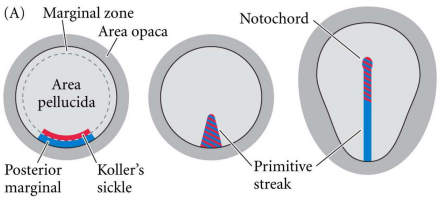




Development 128, 2915-2927 (2001)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2001
DEV3224

Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo

Isaac Skromne* and Claudio D. Stern‡,§



Foice de Koller

Vg1

Wnt

Linha Primitiva

Skromen and Stern, Development 2001 Aug;128(15):2915-27.

Nieuwkoop

sapo

β-catenina

siamois

Xnr-1

Mesoderma Dorsal (Org)

VegT e outros TGF-betas

Mesoderma Ventral

ave

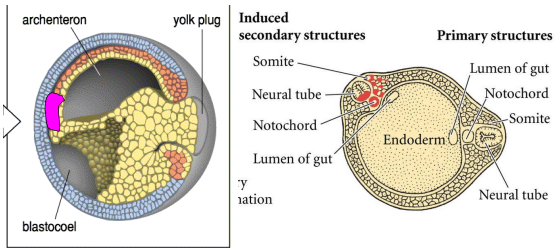
Foice de Koller

Vg1

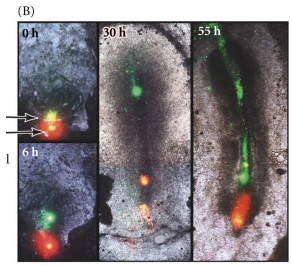
Wnt/beta-catenina

Linha Primitiva(nó de Hensen)

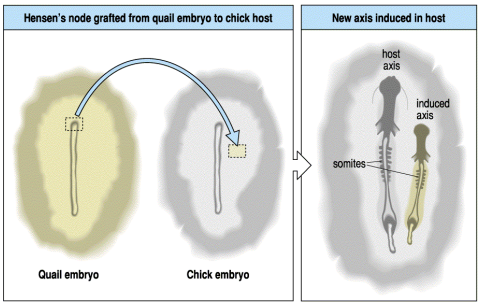
1. Após a gastrulação, as células do Organizador irão formar a notocorda



1. Após a gastrulação, as células do Nó de Hensen (marcadas em verde) irão formar a notocorda

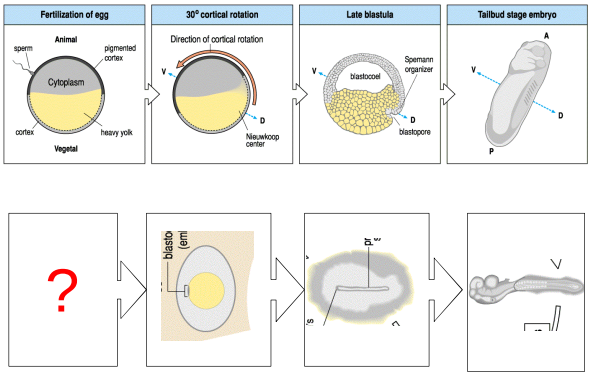


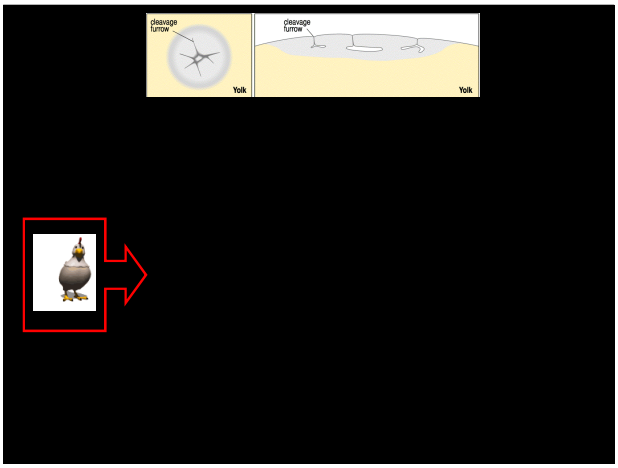
2.O transplante do nó de Hensen também duplica eixos

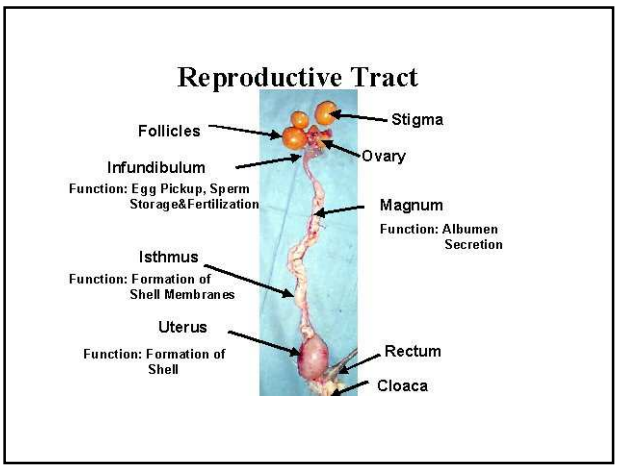


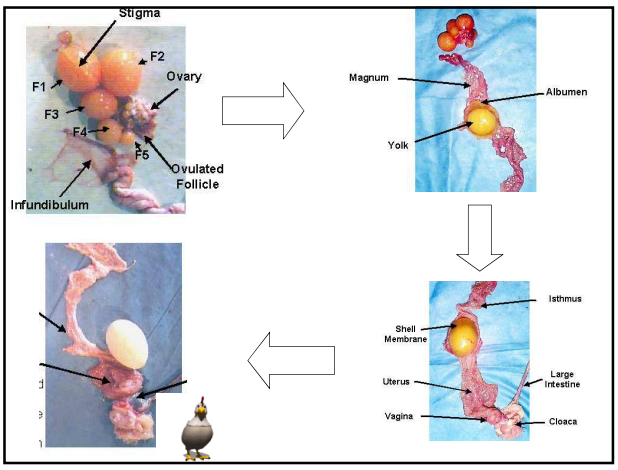
Wolpert, Biologia do Desenvolvimento

O QUE DEFINE ONDE acumulará Veg1/VgT?

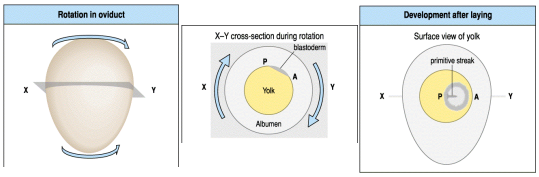








O eixo antero-posterior é determinado *no oviduto* durante o rolamento da gema



Mas,será que o ponto de entrada do espermatozóide determina a direção do rolamento???

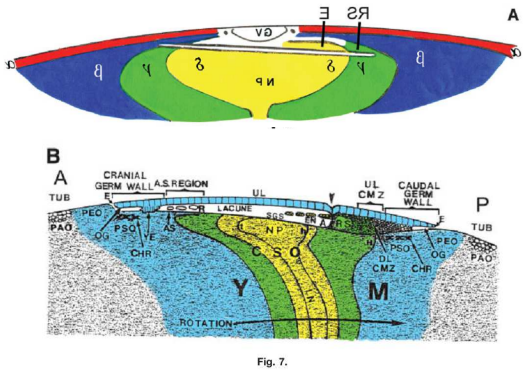
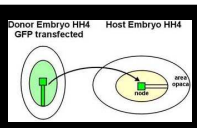


Fig. 7.

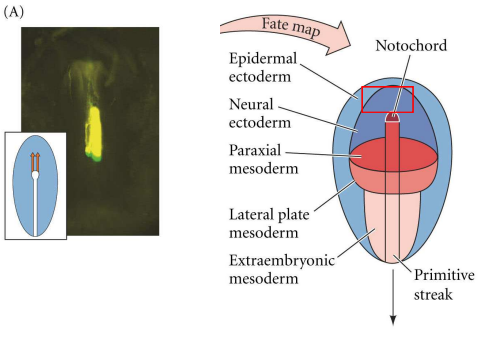
DEVELOPMENTAL DYNAMICS 233:1194–1216, 2005

O eixo ANTERO-POSTERIOR é mantido?

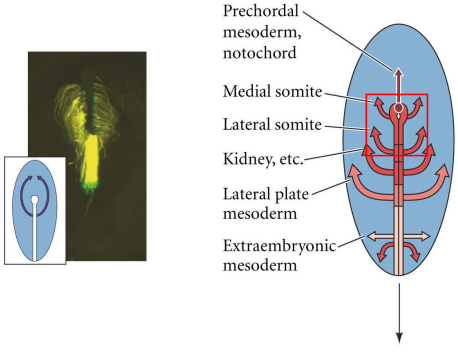


Yang, X., D. Dormann, A. E. Münsterberg and C. J. Weijer. 2002. *Dev. Cell* 3: 425–437.

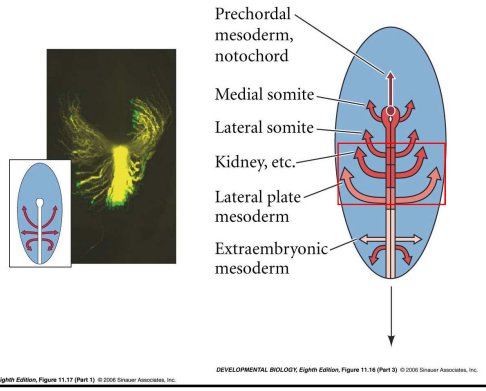
As células da região mais anterior da linha primitiva formam o endoderma anterior e o mesoderma pré-cordal



As células da região mediana da linha primitiva formam a notocorda, e estruturas mesodérmicas laterais

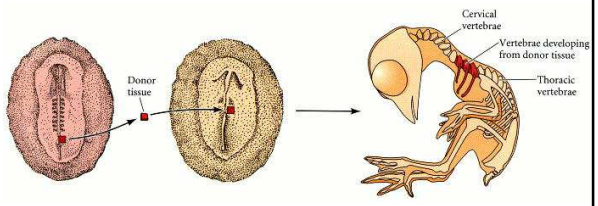


As células da região mediana posterior da linha primitiva formam a notocorda, e estruturas mesodérmicas laterais



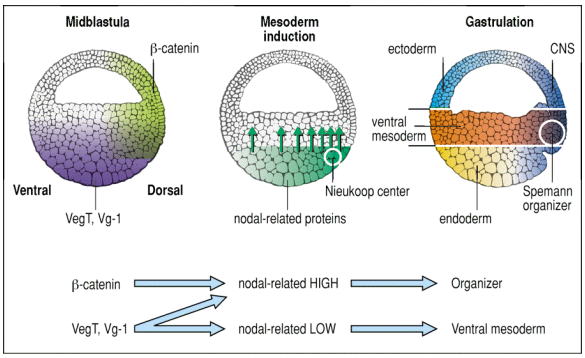
A neurulação e os somitos são formados numa ordem antero-posterior

2. Existe uma identidade antero-posterior na sequência de somitos.

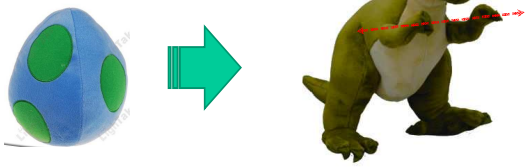


COMO QUE A IDENTIDADE ANTERO-POSTERIOR INICIAL É TRADUZIDA durante a organogênese?

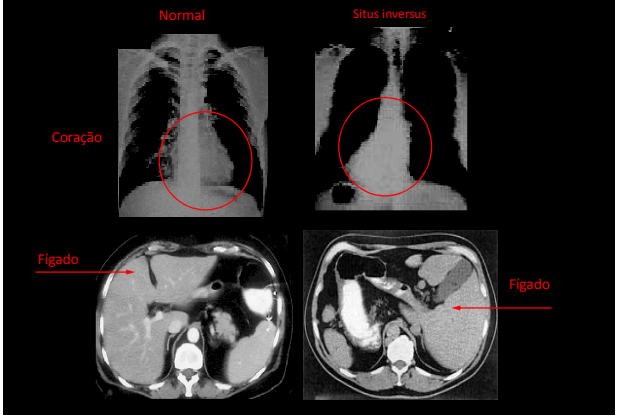
Não percam! No próximo capítulo do dia 28 de Maio – Episódio HOX – a família que veio da tumba

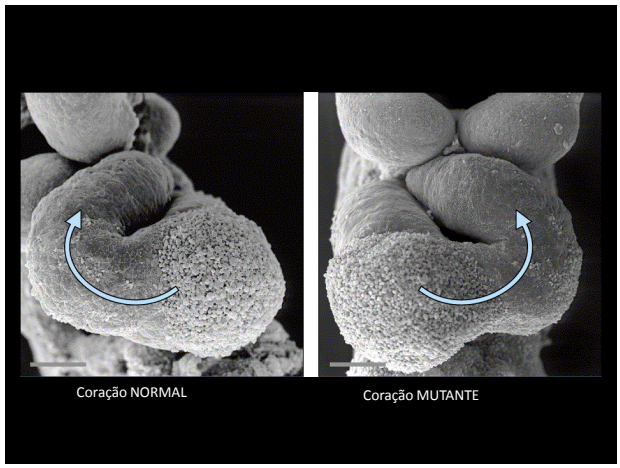


O eixo Levo-dextro



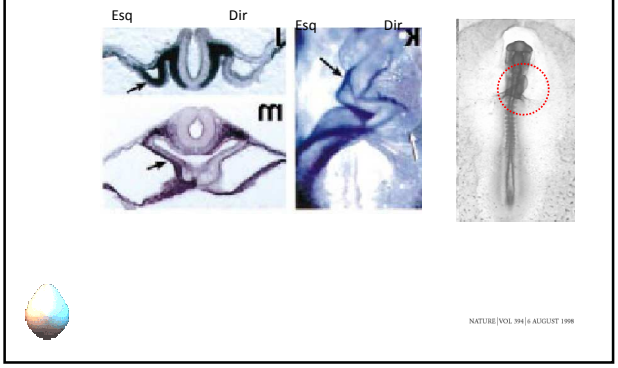
ALTERAÇÕES DO EIXO LEVO-DEXTRO EM HUMANOS





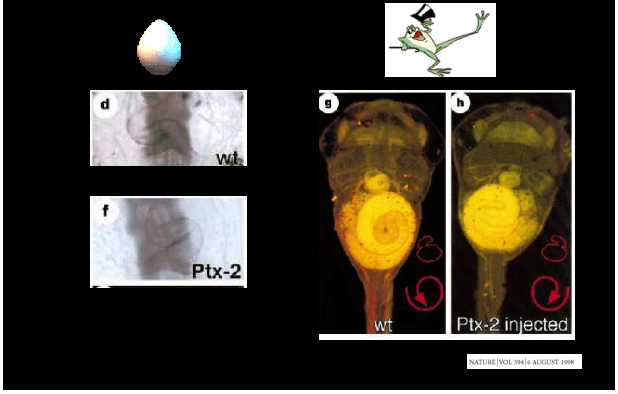
Pitx2 está no lado esquerdo do tubo cardíaco

Pitx2: proteína nuclear, fator de transcrição



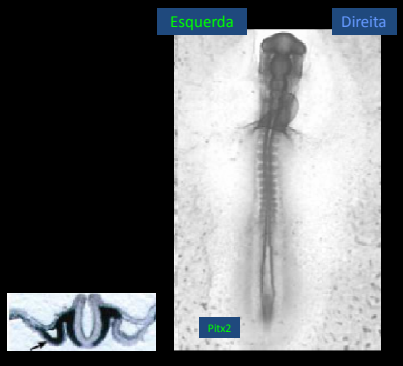
NATURE | VOL 394 | 6 AUGUST 1998

A expressão de Pitx-2 no lado direito altera o eixo levo-dextro



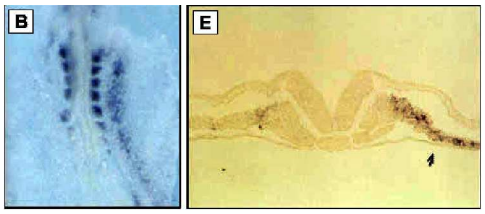
NATURE | VOL 394 | 6 AUGUST 1998

DETERMINAÇÃO DO EIXO LEVO-DEXTRO EM Gallus



A proteína nuclear Snail é expressa do lado direito apenas

Snail: fator de transcrição



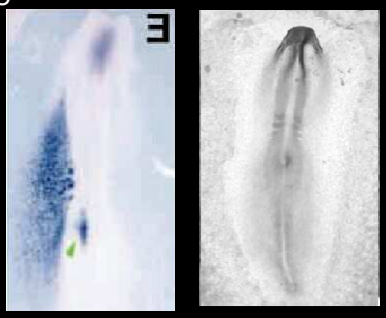
SCIENCE • VOL. 275 • 28 FEBRUARY 1997

DETERMINAÇÃO DO EIXO LEVO-DEXTRO EM Gallus

HH 10

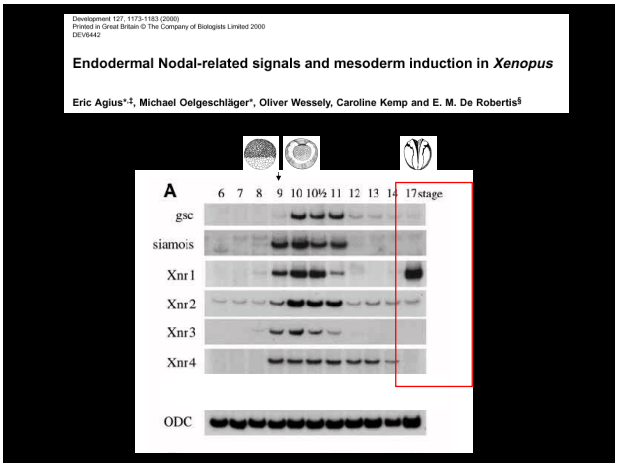
Antes de Pitx-2, o Nodal é expresso exclusivamente no lado ESQUERDO

Nodal: proteína secretada

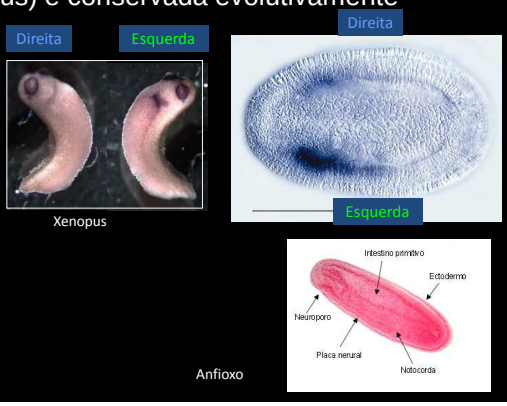


HH8-

Schlange et al 2002



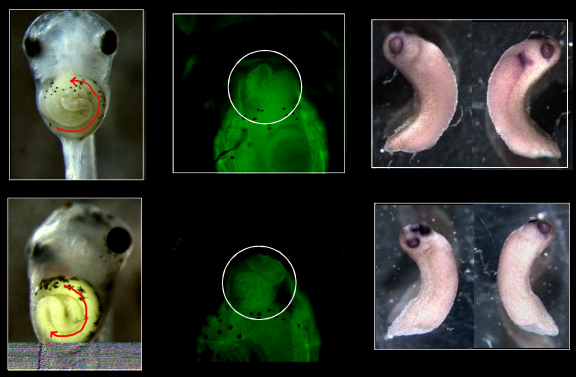
A assimetria de expressão de Nodal (=Xnr-1 em Xenpus) é conservada evolutivamente



Anfioxo

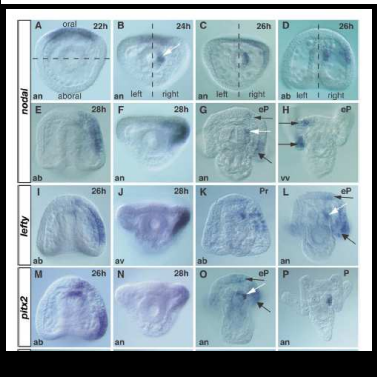
Síndromes = Efeito Eddie Murphy

ALTERAÇÕES DO EIXO LEVO-DEXTRO AFETAM A EXPRESSÃO DE NODAL

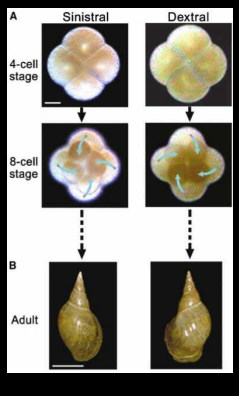


Developmental Cell, Vol. 9, 147–158, July, 2005, Copyright ©2005 by Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.devcel.2005.05.008

Left-Right Asymmetry in the Sea Urchin Embryo Is Regulated by Nodal Signaling on the Right Side

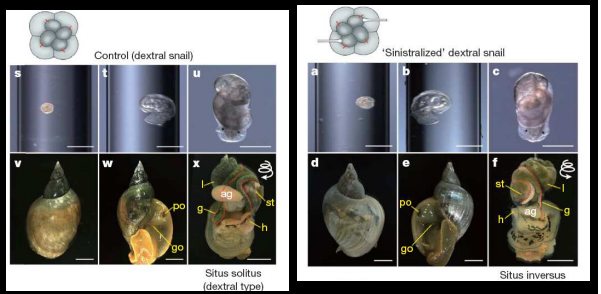


A quiralidade da *Lymnea stagnalis* provém de um locus maternal e é evidenciada nas primeiras clivagens



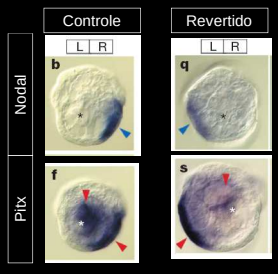
Curr Biol. 2004 Aug 24;14(16):1462-7.

A inversão artificial da direção dos blastômeros inverte o eixo



Nature. 2009 Dec 10;462(7274):790-4.

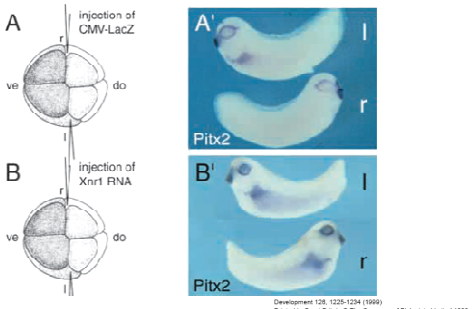
A inversão artificial da direção dos blastômeros inverte o eixo E A EXPRESSÂO GÊNICA reflete isto.



)

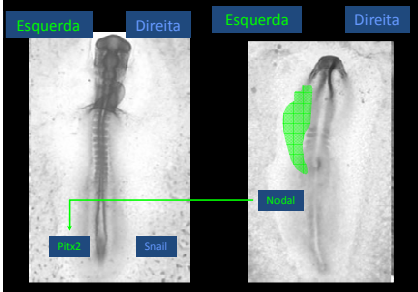
GENES NO EIXO LEVO-DEXTRO EM GALINHA

Nodal (Xnr-1) regula a expressão de Pitx-2

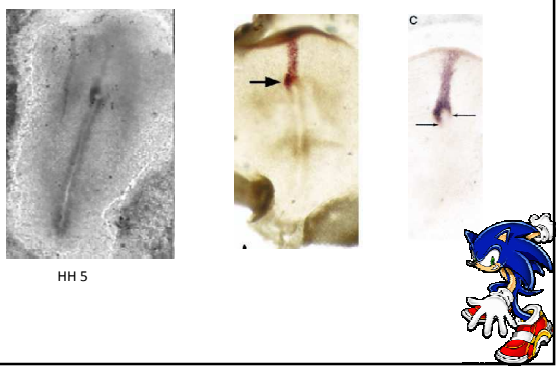


Development 126, 1225-1234 (1999)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1999
DEV2373

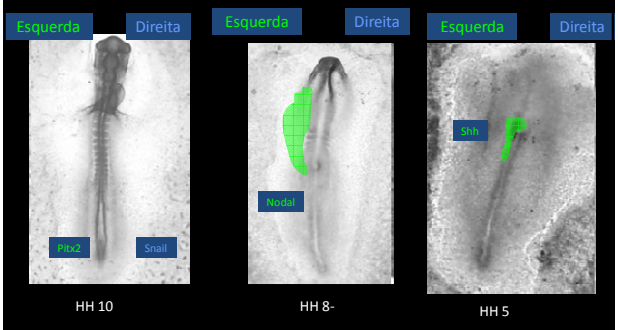
GENES NO EIXO LEVO-DEXTRO EM GALINHA



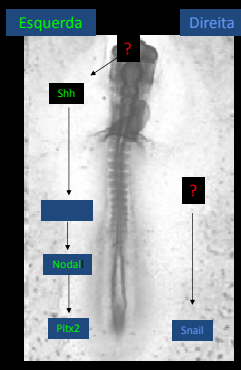
O Shh é assimetricamente expresso no Nó de Hensen



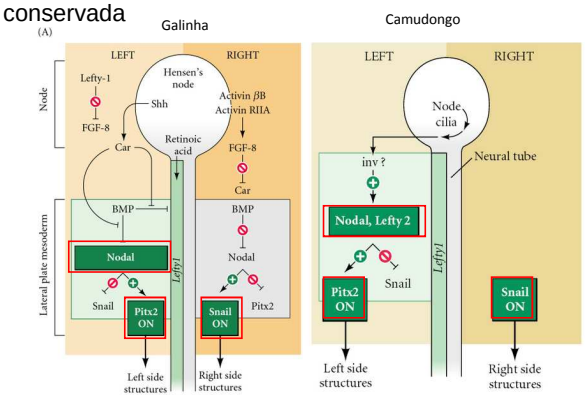
GENES NO EIXO LEVO-DEXTRO EM GALINHA



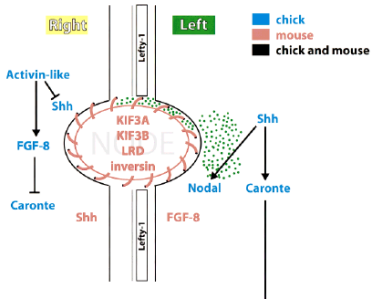
DETERMINAÇÃO DO EIXO LEVO-DEXTRO EM GALINHA



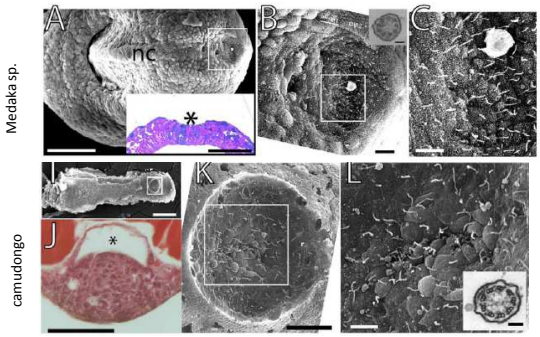
A via de sinalização do eixo levo-dextro é bem conservada



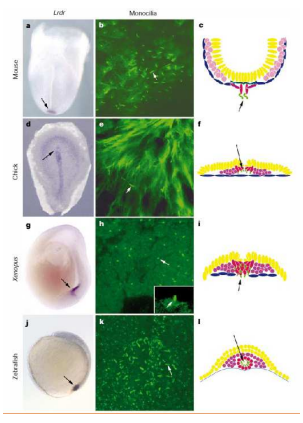
Baseado em dados de camudongos mutantes, propõe-se a existência de cílios com batimento direcionado no Nó de Hensen e estruturas equivalentes.



American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.) 97:271–279 (2000)



Cell, Vol. 121, 633–644, May 20, 2005,



Cílios estão presentes em nós ou nó-equivalentes de várias espécies

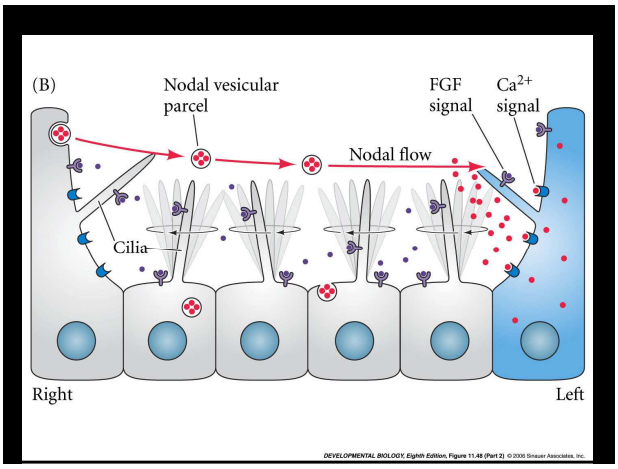
NATURE | VOL 418 | 4 JULY 2002 | www.nature.com/nature

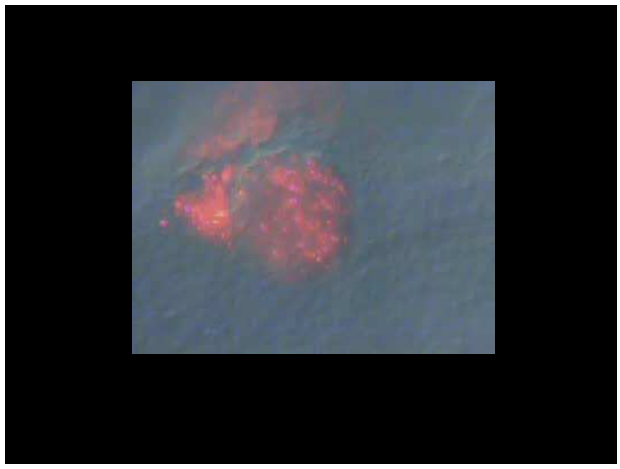
A presença dos cílios precede o aparecimento do primeiro gene assimétrico

Table 1 Nodal cilia features in different vertebrate classes

	Onset of Lrdr mRNA expression	*Appearance of nodal cilia*	*Earliest conserved asymmetric gene expression*
Mouse	Gastrula, 7.5 d.p.f.	Gastrula, 7.5 d.p.f.	*Nodal*, 8.25 d.p.f., 3–5 somites
Chick	Gastrula, HH4 –	Gastrula, HH4 –	*Nodal*, HH7*, 0–2 somites
Xenopus	Stage-11 gastrula	Stage-14 neurula	*Xnr-1* (*Nodal*), stage-17 neurula
Zebrafish	80% epiboly gastrula	Four somites	*Cyclops* (*Nodal*), 20 somites

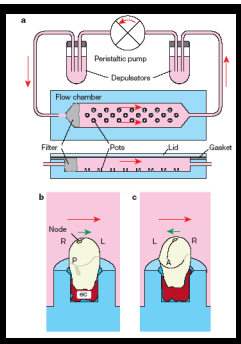
*Asymmetric gene expression of *Sonic hedgehog* at the node occurs at HH5 (gastrulation) before *Nodal* expression, but seems to be unique to the chick embryo.
d.p.f., days post-fertilization.





Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow

Shigenori Nonaka, Hidetaka Shiratori, Yukio Saijoh & Hiroshi Hamada



NATURE | VOL 418 | 4 JULY 2002 | www.nature.com/nature

O que determina a direcionalidade dos cílios?