Felipe Monteleone Vieceli

**Clonagem e análise da expressão do fator de
transcrição Scratch2 durante a embriogênese
inicial de galinha**

São Paulo

2009

Felipe Monteleone Vieceli

**Clonagem e análise da expressão do fator de
transcrição Scratch2 durante a embriogênese
inicial de galinha**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientação: Dra. Chao Yun Irene Yan

São Paulo

2009

DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vieceli, Felipe Monteleone.

Clonagem e análise da expressão do fator de transcrição Scratch2 durante a embriogênese inicial de galinha. / Felipe Monteleone Vieceli. – São Paulo, 2009.

Orientador: Chao Yun Irene Yan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Fatores moleculares envolvidos na diferenciação neural no embrião de vertebrados.

Versão do título para o inglês: Cloning and expression analysis of the transcription factor Scratch2 during chick early embryogenesis.

Descritores: 1. Embriologia molecular 2. Fatores de transcrição 3. Medula espinhal 4. Diferenciação celular 5. Clonagem molecular 6. Hibridização I. Yan, Chao Yun Irene II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0178/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Monteleone Vieceli.

Título da Dissertação: Clonagem e análise da expressão do fator de transcrição Scratch2 durante a embriogênese inicial de galinha.

Orientador(a): Chao Yun Irene Yan.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.002.2006.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 002/06/CEEA, aprovo a inclusão do aluno:
FELIPE MONTELEONE VIECELI ao protocolo intitulado: ***"Embriologia molecular do sistema nervoso de vertebrados"***, para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. Chão Yun Irene Yan, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 30 de agosto de 2006.

Prof. Dr. UBRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA- ICB/USP

Aos meus pais pelo incentivo e apoio
que possibilitaram minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Chao Yun Irene Yan pela dedicada orientação durante todo o meu aprendizado científico, além da amizade que fez parte de nossa relação.

À minha família pelo incentivo durante toda a minha formação e entusiasmo por minha opção acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Anselmo Sigari Moriscot, Dra. Dânia Hamassaki-Britto, Dr. Emer Suavinho Ferro e Dra. Maria Tereza Nunes pelo generoso empréstimo de equipamentos e reagentes que possibilitaram esse trabalho.

Ao Dr. José Xavier Neto e Dr. Diogo Meyer pelo auxílio com a análise de sequências obtidas durante a etapa de clonagem, ao Dr. Shankar Srinivas pelo protocolo de hibridação *in situ* em cortes e ao Dr. Panagiotis Politis pela doação das sondas *cNotch1* e *cSCG10*.

Ao técnico Antonio Turri pela preparação dos cortes histológicos.

Aos colegas Dr. Marcelo Augusto Christoffolete, Marcelo Larciprete Leal e Igor Luchini Baptista pelo auxílio com a técnica de PCR em tempo real.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia Molecular dos Vertebrados pela amizade e contribuição em diversas etapas desse trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual e de outros laboratórios de Biologia do Desenvolvimento pelas conversas científicas e pelos momentos de confraternização.

Aos amigos do Instituto de Biociências pela amizade e convivência diária.

À minha namorada Marina pela companhia constante.

RESUMO

Vieceli FM. Clonagem e análise da expressão do fator de transcrição Scratch2 durante a embriogênese inicial de galinha [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Em invertebrados, os genes *Scratch* (*Scrt*) codificam fatores de transcrição que promovem a neurogênese durante o desenvolvimento. A função de *Scrt* em vertebrados é desconhecida, mas em camundongos *Scrt1* e *Scrt2* são especificamente expressos em neurônios pós-mitóticos no embrião e no sistema nervoso central adulto. Neste trabalho, nós clonamos a sequência codificante de *Scrt2* de galinha (*cScrt2*) e caracterizamos seu padrão de expressão no embrião por PCR quantitativo e hibridação *in situ*. A sequência codificante completa foi clonada no vetor de expressão pMES-GFP e o produto previsto da tradução é uma proteína com 276 aminoácidos. A sequência de aminoácidos compartilha identidades de 70% com *Scrt2* de rato e 58% com *Scrt* de zebrafish. Transcritos *cScrt2* são detectados primeiramente na periferia do tubo neural do rombencéfalo em HH 15 e da medula espinhal em HH 17, coincidindo com os locais onde alguns dos primeiros neurônios se diferenciam durante a embriogênese. Entre HH 19-23, a expressão no domínio motor da medula espinhal se concentra progressivamente na interface entre as zonas ventricular e do manto. Além disso, a expressão de *cScrt2* também é observada nos gânglios da raiz dorsal a partir de HH 22-23, principalmente no domínio dorsomedial. O campo de expressão de *cScrt2* no tubo neural é complementar aos de *Notch1*, que é expresso em células-tronco neurais, e *SCG10*, marcador de neurônios diferenciados. Nossos resultados sugerem que durante a embriogênese da medula espinhal *cScrt2* é especificamente expresso em neurônios pós-mitóticos indiferenciados. A construção pMES-GFP(*cScrt2*) possibilita futuras análises funcionais diretas por interferência gênica no embrião de galinha, que serão de grande valor para um melhor entendimento da função dos genes *Scrt* em vertebrados.

Palavras-chave: Scratch. Neurogênese. Medula espinhal.

ABSTRACT

Vieceli FM. Cloning and expression analysis of the transcription factor Scratch2 during the chicken early embryogenesis [Master thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas at Universidade de São Paulo; 2009.

In invertebrates, the *Scratch* (*Scrt*) genes encode transcription factors that promote neurogenesis during development. The *Scrt* function in vertebrates is unknown, but in mice *Scrt1* and *Scrt2* are specifically expressed in post-mitotic neurons in the embryo and in the adult central nervous system. In this work, we have cloned the coding sequence of chicken *Scrt2* (*cScrt2*) and characterized its expression pattern in the embryo with quantitative PCR and *in situ* hybridization. The complete coding sequence was cloned in the expression vector pMES-GFP and the predicted translation product is a 276-aminoacids protein. The aminoacid sequence shares identities of 70% with rat *Scrt2* and 58% with zebrafish *Scrt*. *cScrt2* transcripts are firstly detected in the periphery of the neural tube in the hindbrain by HH 15 and in the spinal cord by HH 17, coinciding with the places where some of the first neurons differentiate during embryogenesis. Between HH 19-23, the expression in the motor domain of the spinal cord is progressively concentrated in the interface between the ventricular and mantle zones. Furthermore, *cScrt2* expression is also observed in the dorsal root ganglia after HH22-23, particularly in the dorsomedial domain. The expression pattern of *cScrt2* in the neural tube is complementary to that of *Notch1*, which is expressed in neural stem cells, and *SCG10*, a marker for differentiated neurons. Our results suggest that during embryogenesis *cScrt2* is specifically expressed in post-mitotic undifferentiated neurons. The construction pMES-GFP(*cScrt2*) makes possible future direct functional analysis by genetic interference in the chick embryo, which will be of great value for better understanding the *Scrt* genes function in vertebrates.

Keywords: Scratch. Neurogenesis. Spinal cord.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Neurulação	15
Figura 2. Zonas da medula espinhal durante a embriogênese	16
Figura 3. Fatores expressos durante a neurogênese	17
Figura 4. A superfamília Snail de fatores de transcrição	21
Figura 5. Expressão de <i>mScrt1</i> e <i>mScrt2</i> na medula espinhal embrionária	24
Figura 6. Primers utilizados e clonagens parciais	33
Figura 7. O primer degenerado Fw4	34
Figura 8. Clonagem da região 5' de <i>cScrt2</i>	46
Figura 9. Clonagem da sequência completa de <i>cScrt2</i>	46
Figura 10. A proteína cScrt2	47
Figura 11. Homologia de cScrt2	48
Figura 12 Potenciais sítios de fosforilação em cScrt2	49
Figura 13. Árvore filogenética da família Scrt em cordados	50
Figura 14. Variação temporal da expressão de <i>cScrt2</i> durante a embriogênese	50
Figura 15. Sondas <i>cScrt2</i> utilizadas e expressão entre HH 8-10	51
Figura 16. Expressão de <i>cScrt2</i> entre HH 17 e E6	53
Figura 17. Comparação da expressão de <i>cScrt2</i> com outros fatores expressos durante a neurogênese	55
Figura A1. Clonagem de <i>cScrt2(434pb)</i>	72

Figura A2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (434pb)	72
Figura B1. Clonagem de <i>cSqrt2</i> (204pb).....	74
Figura B2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (204pb).....	74
Figura C1. Clonagem de <i>cSqrt2</i> (369pb).....	76
Figura C2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (369pb).....	76
Figura D1. Clonagem de <i>cSqrt2</i> (320pb).....	78
Figura D2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (320pb)	78
Figura E1. Clonagem de <i>cSqrt2</i> (323pb)	80
Figura E2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (323pb).....	80
Figura F1. Clonagem de <i>cSqrt2</i> (full).....	82
Figura F2. Sequência de <i>cSqrt2</i> (full) (1-459).....	82
Figura F3. Sequência de <i>cSqrt2</i> (full) (338-831).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cScrt2 – Scrt2 de galinha; grafia em itálico refere-se a moléculas nucleicas

cScrt2 – Scrt2 de galinha; grafia regular refere-se a moléculas proteicas

GRD – Gânglio da Raiz Dorsal

bHLH – *basic Helix-Loop-Helix* (hélice-alça-hélice básico)

bZIP – *basic-leucine-zipper* (zíper-básico-leucina)

HMG – *High Mobility Group* (Grupo de Alta Mobilidade)

DNA – *Desoxirribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

cDNA – *complementary DNA* (DNA complementar)

DNase – Desoxirribonuclease

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNA_m – RNA mensageiro

RNAse – Ribonuclease

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta Básica para Busca por Alinhamento Local)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)

RT – *Reverse Transcription* (Transcrição Reversa)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação de Polimerização em Cadeia)

RACE – *Rapid Amplification of cDNA Ends* (Amplificação Rápida das Extremidades do cDNA)

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDO

Alanina.....	A
Arginina.....	R
Asparagina.....	N
Aspartato.....	D
Cisteína.....	C
Fenilalanina.....	F
Glicina.....	G
Glutamato.....	E
Histidina.....	H
Isoleucina.....	I
Leucina.....	L
Lisina.....	K
Metionina.....	M
Prolina.....	P
Serina.....	S
Tirosina.....	Y
Treonina.....	T
Triptofano.....	W
Valina.....	V

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Neurogênese em vertebrados.....	15
1.2 Fatores moleculares envolvidos na neurogênese.....	17
1.3 A família Scratch de fatores de transcrição.....	21
1.3.1 A proteína Scratch	21
1.3.2 A função de Scratch na neurogênese.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Obtenção de embriões.....	27
3.2 Transcrição Reversa – Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR).....	28
3.2.1 Extração de RNA.....	28
3.2.2 Síntese de cDNA	29
3.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	31
3.3 Clonagem	32
3.3.1 RACE-PCR.....	32
3.3.2 Amplificação de fragmentos parciais de cScrt2.....	33
3.3.3 Amplificação da região 5' da sequência codificante de cScrt2	34
3.3.4 Amplificação da sequência codificante completa de cScrt2	34
3.3.5 Clonagem dos produtos de PCR.....	35
3.3.6 Subclonagem do clone completo de cScrt2 para o vetor de expressão pMES-GFP	37
3.4 Construção da árvore filogenética	37
3.5 Análise temporal de expressão (PCR)	38
3.5.1 PCR semi-quantitativo	38
3.5.2 PCR quantitativo	38
3.6 Hibridação <i>in situ</i>	38
3.6.1 Transcrição da sonda.....	39
3.6.2 Fixação do material.....	40
3.6.3 Procedimento para embriões inteiros.....	41
3.6.4 Procedimento para cortes histológicos.....	42
4 RESULTADOS	45

4.1 Clonagem da sequência codificante de <i>cScrt2</i>	45
4.1.1 <i>Clonagem</i>	45
4.1.2 <i>Tradução prevista</i>	47
4.1.3 <i>Análise filogenética</i>	49
4.2 Análise do padrão de expressão de <i>cScrt2</i> no embrião de galinha	50
4.2.1 <i>Análise temporal</i>	50
4.2.2 <i>Análise espacial</i>	51
4.3 Expressão de <i>cScrt2</i> em relação a outros fatores envolvidos na neurogênese	54
5 DISCUSSÃO	56
5.1 <i>Evolução da família Scrt em amniotos</i>	56
5.2 <i>Domínios de cScrt2</i>	56
5.3 <i>Conservação da expressão de Scrt durante a embriogênese de vertebrados</i>	57
5.4 <i>Função de Scrt dentro do processo de neurogênese</i>	59
5.5 <i>Scrt e a cascata molecular do programa neural</i>	61
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	71
ANEXO A – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (434pb)	72
ANEXO B – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (204pb)	74
ANEXO C – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (369pb)	76
ANEXO D – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (320pb)	78
ANEXO E – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (323pb)	80
ANEXO F – Sequenciamento de <i>cScrt2</i> (full)	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurogênese em vertebrados

Em embriões de vertebrados, o sistema nervoso é derivado da placa neural, formada logo após a gastrulação como uma região espessada da ectoderme, também chamada de neuroepitélio. A placa neural ocupa a região dorsal mediana do embrião e se estende ao longo do eixo antero-posterior. A neurulação converte a placa neural no tubo neural, estabelecendo a estrutura rudimentar do sistema nervoso central (Fig. 1). O cérebro do adulto é originado pela porção rostral do tubo neural, enquanto a medula espinhal é originada pela porção caudal. A crista neural, determinada nas periferias da placa neural e localizada dorsalmente ao tubo neural após a neurulação, dá origem a todo o sistema nervoso periférico (Jacobson, 1991).

Quando o tubo neural se fecha, o neuroepitélio é uma monocamada de células bipolares que delimita o lúmen ventricular. A região basal dessas células contata a lâmina basal na periferia do tubo, enquanto a região apical está em contato com o lúmen ou ventrículo. Os neurônios são gerados apenas pelas regiões laterais do tubo neural, sendo as placas do teto e do assoalho responsáveis pela produção de morfógenos que padronizam os diferentes tipos neurais ao longo do eixo dorso-ventral. Na medula espinhal, o tubo neural pode ser dividido funcionalmente em um domínio dorsal, com neurônios que recebem informações sensoriais, e um domínio ventral, com neurônios motores (Gilbert, 2006; Sanes et al., 2006).

A neurogênese é o processo de nascimento de neurônios, e sucede a fase

Figura 1 - Neurulação. Esquema de corte transversal do embrião de galinha mostrando a formação do tubo neural a partir da placa neural.
FONTE: modificado de Wolpert et al., 2008.

proliferativa das células-tronco neurais. Durante o ciclo celular, os núcleos das células em proliferação migram através do tubo neural pelo cilindro citoplasmático, em um processo chamado de migração nuclear intercinética. A síntese de DNA (fase S) ocorre enquanto o núcleo se encontra na região basal da célula, e o ciclo celular continua durante a migração para a porção apical, onde se dá a divisão celular (Chenn e McConnell, 1995). O último ciclo de mitose que precede a neurogênese é assimétrico: uma célula-filha se mantém indiferenciada e inicia outro ciclo celular,

enquanto a outra inicia o programa de diferenciação neural e não se divide novamente. Esse é considerado o momento de nascimento do neurônio. O plano da divisão celular assimétrica é perpendicular ao eixo ápico-basal, onde a nova célula-tronco é a que fica mais próxima do ventrículo. Os neurônios recém-nascidos então migram em direção à periferia do tubo neural, iniciando o processo de diferenciação neural durante esse trajeto. Esses neurônios se acumulam nas regiões mais externas do tubo neural, segregando-se das células proliferativas que permanecem próximas ao ventrículo (Hollyday, 2001). Portanto, durante a embriogênese inicial, o tubo neural pode ser dividido funcionalmente em zonas dispostas concentricamente em torno do lúmen: uma zona ventricular proliferativa com células-tronco, uma zona intermediária com células pós-mitóticas indiferenciadas e uma zona periférica com neurônios diferenciados, ou zona do manto (Fig. 2).

As fases de proliferação dos precursores neurais e de neurogênese ocorrem em períodos definidos do desenvolvimento. No embrião de galinha, algumas pequenas populações de neurônios são formadas ainda antes do fechamento do tubo neural (Sechrist e Bronner-Fraser, 1991), mas o evento de neurogênese é generalizado somente após o fechamento do tubo neural (Hollyday e Hamburger, 1977). Tipicamente em vertebrados, a neurogênese ocorre primeiro no rombencéfalo, seguido pela medula espinhal e pelo

Figura 2 - Zonas da medula espinhal durante a embriogênese. O esquema delimita zonas reconhecíveis da medula espinhal durante seu desenvolvimento inicial. mn: domínio de motoneurônios; zm: zona do manto; zv: zona ventricular. N: notocorda; PA: placa do assoalho; PT: placa do teto; V: ventrículo.

mesencéfalo (Sechrist e Bronner-Fraser, 1991). A neurogênese no prosencéfalo é mais tardia e continua por um período maior. Na medula espinhal do embrião de galinha, a neurogênese se inicia entre E2 e E3 (dias embriônicos), e a população de motoneurônios é a primeira a se diferenciar (Ericson et al., 1992; Fujita, 1964).

1.2 Fatores moleculares envolvidos na neurogênese

Durante o processo de neurogênese, a regulação orquestrada de diversos fatores é necessária para determinar o início e a progressão da diferenciação neural. Alguns fatores são essenciais para a manutenção do estado proliferativo e indiferenciado das células-tronco, e sua desativação acompanha o nascimento do neurônio. A diferenciação do neurônio ocorre de forma gradual durante seu trajeto para a zona do manto, durante o qual uma complexa rede de fatores de transcrição pró-neurais é ativada progressivamente.

A segregação do tubo neural em zonas de proliferação e diferenciação se reflete no padrão de expressão dos fatores envolvidos nas diferentes fases da neurogênese. Genes importantes para a manutenção do estado indiferenciado são expressos apenas na zona ventricular, enquanto genes que codificam proteínas envolvidas na biologia do neurônio diferenciado são expressos apenas na zona do manto. Além disso, genes envolvidos especificamente em fases de transição entre a célula-tronco e o neurônio diferenciado são expressos apenas na interface entre as zonas ventricular e do manto. Por exemplo, na medula espinhal inicial do embrião de galinha podemos perceber a seguinte sequência de expressão gênica do centro para a periferia: *Notch1* → *Sox3* → *NeuroM* → *SCG10* (Fig. 3).

Figura 3 - Fatores expressos durante a neurogênese. Cortes transversais da medula espinhal do embrião de galinha em estágio HH 23 (Hamburger e Hamilton, 1951) mostrando a expressão de *Notch1* e *Sox3* em células proliferantes e indiferenciadas (Bylund et al., 2003; Politis et al., 2007), *NeuroM* em células pós-mitóticas e indiferenciadas (Roztocil et al., 1997) e *SCG10* em neurônios diferenciados (Politis et al., 2007).

A via Notch/Delta é evolutivamente conservada na sua importância em manter o equilíbrio entre as populações neurais progenitora e em diferenciação durante o desenvolvimento. A ativação do receptor Notch pelo seu ligante Delta induz a proteólise de Notch e a translocação do seu domínio intracelular para o núcleo. No núcleo, um dos efeitos da ativação de Notch é a repressão da síntese de Delta. O resultado dessa retroalimentação negativa é a conversão de uma população inicialmente duplamente positiva para Notch/Delta em duas populações: uma que expressa Notch e outra que expressa Delta (Cornell e Eisen, 2005). Esta segregação está refletida no padrão de expressão de Notch e Delta na medula espinhal do embrião. A expressão de Notch é exclusiva das células-tronco mitoticamente ativas na zona ventricular. Por sua vez, a região mais interna do campo de expressão de Delta coincide apenas parcialmente com a de Notch, e inclui também células Notch-negativas localizadas em uma camada mais externa, representando as células neurais que deixaram o ciclo celular (Hämmerle e Tejedor, 2007; Henrique et al., 1995; Myat et al., 1996). No núcleo, Notch também induz a expressão dos fatores de transcrição do tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH) da família Hes, que inibem a diferenciação neural através da repressão da expressão de fatores de transcrição pró-neurais também do tipo bHLH (Bertrand et al., 2002). Assim, as células Notch-positivas permanecem indiferenciadas e continuam mitoticamente ativas, auto-renovando a população de células-tronco a cada geração. Consistente com sua função de manutenção do estado indiferenciado, a ativação ectópica de Notch1 na medula espinhal do embrião de galinha foi capaz de suprimir a neurogênese nesse local. No entanto, não foi observado aumento de proliferação. Em contraste, a inibição de Notch1 parece suspender o ciclo celular, mas não pode induzir o início da diferenciação (Hämmerle e Tejedor, 2007).

Outros fatores expressos somente na zona ventricular da medula espinhal embrionária são os membros do subgrupo B1 da família Sox de fatores de transcrição do tipo HMG-box: Sox1, Sox2 e Sox3. Esses fatores são expressos pela maioria dos progenitores do sistema nervoso central em desenvolvimento e também são desativados durante a neurogênese (Bylund et al., 2003; Pevny et al., 1998; Uwanogho et al., 1995). A expressão de Sox1-3 na medula espinhal do embrião de galinha não é capaz de induzir a proliferação, mas é suficiente para manter as células neurais em estado indiferenciado (Bylund et al., 2003). Esses dados indicam que Sox1-3 trabalham para manter o estado indiferenciado das células-

tronco neurais. Interessantemente, o fator de transcrição bHLH pró-neural Neurogenina2 (Ngn2) não foi reprimido pela superexpressão de Sox1-3, ao passo que a superexpressão de Ngn2 foi capaz de reprimir a expressão de Sox1-3 e de induzir a diferenciação neural completa (Bylund et al., 2003). Portanto, para que a diferenciação neural completa seja alcançada, os genes SoxB1 devem ser adequadamente inibidos e seus alvos reprimidos por genes pró-neurais iniciais, como Ngn2. A expressão de Sox1-3, assim como de Notch, também pode ser utilizada para identificar os progenitores neurais indiferenciados da medula espinhal.

A maturação da célula pós-mitótica ocorre de forma gradual no seu trajeto para a zona do manto, durante o qual a complexa rede de fatores de transcrição que rege o programa neural é ativada. Entre estes, se destacam os fatores bHLH pró-neurais, cuja função essencial no processo de diferenciação neural foi conservada durante a evolução de Metazoa (Bertrand et al., 2002). Um dos primeiros fatores de transcrição bHLH expressos pelos neurônios pós-mitóticos da medula espinhal no embrião de galinha é *NeuroM*. As células que expressam *NeuroM* não incorporam BrdU, e seu campo de expressão é ligeiramente mais externo ao de *Delta1* (Roztocil et al., 1997). Portanto, *NeuroM* é expresso em células pós-mitóticas após a definição do destino de diferenciação pela via Notch/Delta. Interessantemente, na medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal *NeuroM* é desativado em células que expressam *NeuroD* (Roztocil et al., 1997), outro fator bHLH pró-neural que é expresso em estágios mais avançados de diferenciação neural (Lee et al., 1995). Com o final da neurogênese no embrião de galinha, a expressão de *NeuroM* não é mais observada, enquanto *NeuroD* continua sendo expresso (Roztocil et al., 1997). Em conjunto, esses dados indicam a existência de uma sequência de expressão gênica na fase de transição entre a saída do ciclo celular e a diferenciação neural, em que *NeuroM* precede *NeuroD*. Ensaios funcionais com ATH3, homólogo de *NeuroM* em *Xenopus*, mostraram que sua expressão é capaz de induzir neurogênese ectópica (Takebayashi et al., 1997), sugerindo que a função de *NeuroM*/ATH3 nessa fase de transição da neurogênese é a de deflagrar o início da diferenciação neural.

Na zona do manto, neurônios já diferenciados expressam genes que codificam fatores envolvidos na biologia do neurônio jovem, como, por exemplo, proteínas que participam da reorganização do citoesqueleto durante o crescimento de neuritos, ou

neuritogênese. Por exemplo, a expressão da β -tubulina classe III Tuj1 é exclusiva de neurônios pós-mitóticos imaturos em diferenciação (Easter et al., 1993; Lee et al., 1990; Menezes e Luskin, 1994). Outro fator envolvido especificamente no processo de neuritogênese é SCG10, uma proteína desestabilizadora de microtúbulos da família das Stathminas (Stein et al., 1988). Sua expressão é intensa e generalizada em neurônios recém-formados no embrião e em indivíduos jovens, diminuindo com o envelhecimento (Mori e Morii, 2002). Essa dinâmica da expressão de SCG10 está relacionada com a alta plasticidade neuronal durante o desenvolvimento pré-natal e a juventude e com a perda dessa característica em indivíduos idosos. Assim, por serem característicos do processo de rearranjo do citoesqueleto das células neurais, Tuj1 e SCG10 são considerados marcadores de neurônios diferenciados.

Resumidamente, podemos descrever o processo de neurogênese em termos moleculares da seguinte maneira. Em um primeiro momento, a via Notch/Delta define as células que prosseguirão para o destino de diferenciação neural após a divisão celular assimétrica: as novas células-tronco continuam expressando Notch, enquanto os neurônios recém-nascidos expressam somente Delta. Nas células-tronco, Notch induz a expressão dos fatores de transcrição bHLH da família Hes, que inibem a expressão de fatores bHLH pró-neurais, como Ash1. Na célula pós-mitótica, a ausência de Notch faz com que a expressão de fatores bHLH pró-neurais deixe de ser reprimida. Outro passo necessário para o início da diferenciação é a inibição dos genes SoxB1, que estão ativos nos progenitores e trabalham para manter o estado indiferenciado, pelo fator bHLH pró-neural Ngn2. Outros fatores bHLH pró-neurais, como Ngn1 e NeuroM, também são expressos nesses momentos iniciais de diferenciação e, juntamente com Ash1 e Ngn2, trabalham para induzir o início do programa neural (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003). NeuroM é rapidamente desativado com o progresso da diferenciação, ao passo que NeuroD, outro fator bHLH pró-neural, é ativado e se mantém ativo nos estágios finais de diferenciação. Finalmente, proteínas envolvidas no processo de neuritogênese, como Tuj1 e SCG10, têm sua expressão ativada em neurônios diferenciados.

1.3 A família Scratch de fatores de transcrição

1.3.1 A proteína Scratch

O primeiro gene Scratch foi descrito durante o estudo de uma mutação na mosca *Drosophila melanogaster*, que produzia indivíduos descoordenados e com olhos ásperos e arranhados. O gene mutado foi nomeado *scratch* (*scrt*) devido ao fenótipo de olhos arranhados (*scratched eyes*). A clonagem de *scrt* mostrou que esse gene codifica um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* (dedo-de-zinco), e experimentos de hibridação *in situ* mostraram que ele é expresso praticamente em todos os precursores neurais (Roark et al., 1995). Posteriormente, foram caracterizados genes homólogos a *scrt* no nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*ces-1*), em camundongos (*mScrt1* e *mScrt2*) e em humanos (*hScrt1*) (Marín e Nieto, 2006; Metzstein e Horvitz, 1999; Nakakura et al., 2001a). Análises filogenéticas mostraram que a família Scrt é irmã da família Snail. Juntas, as famílias Scrt e Snail formam a superfamília Snail de fatores de transcrição do tipo *zinc-finger* (Nieto, 2002).

Todos os membros da superfamília Snail possuem de quatro a seis domínios *zinc-finger* C₂H₂ na região carboxi-terminal (C-terminal) e, exceto por alguns membros de invertebrados, um domínio amino-terminal (N-terminal) de 9 aminoácidos chamado SNAG (Snail-Gfi). Além disso, os membros da família Scrt possuem um domínio homônimo exclusivo, enquanto as proteínas Snail2 possuem um domínio chamado Slug (Nieto, 2002; Fig. 4). Os *zinc-fingers* são os domínios responsáveis pela ligação desses fatores de transcrição a sequências regulatórias de DNA chamadas E-box (CAGGTG). Essa ligação foi demonstrada tanto para membros da família Snail (Mauhin et al., 1993) quanto da família Scrt (Nakakura et al., 2001a). Além disso, sabe-se que em hSCRT1 a região dos *zinc-fingers* possui o sinal de localização nuclear da proteína (Nakakura et al., 2001a). Na proto-oncoproteína Gfi1, o domínio SNAG parece conferir atividades de repressão e localização nuclear (Grimes et al., 1996). Relatos anteriores indicaram que o domínio SNAG também é importante para

Figura 4 - A superfamília Snail de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição da superfamília Snail são divididos nas famílias Scratch e Snail e possuem um domínio SNAG na região N-terminal e quatro a seis *zinc-fingers* na região C-terminal, além de domínios exclusivos das proteínas Scratch e Snail2 (Slug).

a função de repressão de membros da família Snail (Batlle et al., 2000; Hemavathy et al., 2000; Kataoka et al., 2000). No entanto, análises funcionais realizadas em linhagens celulares revelaram que a atividade de repressão de transcrição de hSCRT1 está concentrada em uma região que exclui os 40 aminoácidos N-terminais e toda a região dos *zinc-fingers* (Nakakura et al., 2001a). Isso significa que o domínio SNAG, que compreende apenas os 9 aminoácidos N-terminais, não é importante para a atividade de repressão em hSCRT1. Portanto, a função do domínio SNAG parece não ter sido conservada dentro da superfamília Snail.

1.3.2 A função de *Scratch* na neurogênese

Os membros da família Snail são considerados elementos-chave no desenvolvimento de vertebrados. Especificamente no desenvolvimento do sistema nervoso, eles atuam na transição epitélio-mesenquimal e na migração das células da crista neural (Nieto, 2002). Por exemplo, a inibição de Snail2 diminui a delaminação de células da crista neural (Nieto et al., 1994), enquanto a superexpressão de Snail1 ou Snail2 aumenta a população de células da crista neural (del Barrio e Nieto, 2002, 2004).

Em contrapartida, análises funcionais diretas de *Scrt* durante o desenvolvimento embrionário foram realizadas apenas em invertebrados. Em *Drosophila*, o fenótipo ocular do mutante é o reflexo de uma redução no número de fotorreceptores e de espaços entre os omatídeos defeituosos. Nessa espécie, a expressão ectópica ubíqua de *scrt* foi suficiente para induzir a produção de neurônios excedentes durante a embriogênese e o desenvolvimento adulto e, curiosamente, levou a uma diminuição no número de cerdas formadas (Roark et al., 1995). Os neuroblastos e as células epidérmicas, que formam as cerdas, são gerados por precursores ectodérmicos comuns. Portanto, esses dados sugerem que os neurônios excedentes são gerados pelo recrutamento de células normalmente comprometidas com o destino epidérmico.

Apesar disso, a mutação nula para *scrt* não produz defeitos óbvios no desenvolvimento do sistema nervoso no embrião quando este é analisado com marcadores de precursores neurais, de neurônios pós-mitóticos ou de células epidérmicas. O fenótipo de redução neural somente é evidente e generalizado em mutantes duplos *scrt; dpn*. O gene *dpn* (*deadpan*) codifica um repressor de transcrição do tipo bHLH, que possui padrão de expressão pan-neural semelhante ao de *scrt*. Os mutantes duplos *scrt; dpn* apresentam um

número bastante reduzido de neurônios do sistema nervoso central e periférico, além de projeções axonais desorganizadas (Roark et al., 1995). Roark et al. sugerem que a ação combinada de *scrt* com outros fatores de transcrição pan-neurais, como *dpn*, promove a diferenciação neural através da repressão de genes não-neurais em neuroblastos.

O ortólogo *Scrt* de *C. elegans* é codificado pelo gene *ces-1* (*cell death specification*). Mutações de perda-de-função de *ces-1* não geram fenótipos evidentes, mas mutações de ganho-de-função resultam em indivíduos com motoneurônios serotoninérgicos (NSM) e interneurônios I2 duplicados. Os neurônios excedentes são, na verdade, células-irmãs que normalmente entram em apoptose durante o desenvolvimento normal. A proteína CES-1 parece proteger especificamente células neurais do processo de apoptose. Em condições normais, a função antiapoptótica de CES-1 é inibida por CES-2, um fator de transcrição do tipo bZIP (basic-leucine-zipper), e nesse caso as células irmãs das NSM e das I2 morrem. A superexpressão de CES-1 não impede a morte celular programada em outras regiões do embrião, portanto sua propriedade antiapoptótica é exclusiva dos subtipos neurais das NSM e das I2 (Ellis e Horvitz, 1991; Metzstein e Horvitz, 1999).

Com os dados obtidos em invertebrados, pode-se dizer que a função de *Scrt* é a de promover a neurogênese. Se nos dois modelos estudados *Scrt* parece promover a diferenciação neural em favor de eventos distintos (diferenciação epidérmica em *Drosophila* e apoptose em *C. elegans*), a sua importância na neurogênese é um ponto comum entre eles. Em vertebrados, não existem estudos diretos da função de *Scrt* durante o desenvolvimento. No entanto, o padrão de expressão dos genes *Scrt* em mamíferos sugere fortemente que sua importância no desenvolvimento neural foi conservada.

Em um primeiro trabalho, Nakakura et al. clonaram o ortólogo *Scrt1* de camundongo (*mScrt1*) e mostraram que, no embrião, esse gene é expresso em neurônios pós-mitóticos da medula espinhal, do tubo neural cefálico, da retina e dos gânglios da raiz dorsal, portanto estando presente no sistema nervoso central e periférico (Nakakura et al., 2001a). Posteriormente, foi identificado no genoma de camundongos outro ortólogo: *mScrt2* (Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005; Manzanares et al., 2001). O padrão de expressão de *mScrt2* também é restrito ao sistema nervoso, mas difere do de *mScrt1* em algumas regiões (Marín e Nieto, 2006). Durante o desenvolvimento, ambos são expressos na zona do manto de todas as regiões do encéfalo, exceto na junção entre o mesencéfalo e o rombencéfalo. A

expressão de ambos os genes também é detectada na zona do manto da medula espinhal, exceto pela zona dos interneurônios V2 no caso de *mScrt2* (Fig. 5). Na placa alar do mesencéfalo e do tálamo, *mScrt2* é expresso com maior intensidade na interface entre as zonas ventricular e do manto, enquanto aí a expressão de *mScrt1* ocorre principalmente na zona do manto. *mScrt1* e *mScrt2*

Figura 5 - Expressão de *mScrt1* e *mScrt2* na medula espinhal embrionária. Ambas as isoformas são expressas na medula espinhal trunca de embrião de camundongo E10,5, mas excluídas da zona ventricular e, no caso de *Scrt2*, da região onde se formam os interneurônios V2 (setas).

FONTE: Retirado de Marín e Nieto, 2006.

também são expressos por derivados da crista neural, como os gânglios das raízes cranial e dorsal e as células de Schwann do nervo vomeronasal que, sendo células gliais, representam a única população não-neural onde a expressão dos genes *mScrt* foi observada durante a embriogênese. A expressão de ambos os genes continua em diversas regiões do sistema nervoso durante o período pós-natal, mas a expressão de *mScrt2* em algumas populações é particularmente interessante. Por exemplo, entre P3 e P9 (dias pós-natal), células migratórias e positivas para GFAP, um marcador de células gliais, da borda dorsal da zona subventricular telencefálica expressam *mScrt2*. Sua expressão também é detectada em células pós-mitóticas migratórias da camada granular externa do cerebelo. É possível que essa expressão de *mScrt2* seja um reflexo de uma função particular sobre a migração de neurônios e glia pós-mitóticos. Entre P9 e P10, a expressão de *mScrt1* se mantém generalizada em diversas estruturas do cérebro, enquanto *Scrt2* é amplamente desativado e permanece significativamente expresso apenas nas células de Schwann do nervo vomeronasal e no giro denteado do hipocampo, considerado um local de proliferação neural no cérebro adulto (Zhao et al., 2006).

Até a presente data, a função de *Scrt* e sua inserção na cascata gênica de diferenciação neural de vertebrados foram investigadas apenas em linhagens celulares. Nakakura et al. mostraram que o tratamento de linhagens de carcinoma embrionário P19 com ácido retinóico, que induz a diferenciação neural dessas células (McBurney, 1993), induziu também uma forte expressão de *hScrt1*. Além disso, a transfecção dessas células com os fatores de transcrição bHLH *Ash1* ou *NeuroD2*, que são capazes de iniciar a

diferenciação neural, também induziu a expressão de *hScrt1*. Representando a única análise funcional direta realizada com genes *Scrt* em células de vertebrados, a superexpressão de *hScrt1* nas células P19 também foi suficiente para induzir a diferenciação neural, detectada pela presença de Tuj1 (Nakakura et al., 2001b). Esses resultados sugerem que uma função dos fatores *Scrt* em promover a diferenciação neural foi conservada em vertebrados.

Consistente com sua inserção na cascata neurogênica, hSCRT1 parece interagir e regular a atividade de outros fatores de transcrição pró-neurais. Em particular, hSCRT1 modula a função de hASH1, que é um fator de transcrição bHLH pró-neural. Ambos os fatores de transcrição do tipo *zinc-finger* e bHLH se ligam às sequências E-box do DNA (Bertrand et al., 2002; Nieto, 2002). Ensaios de repressão de transcrição em linhagens celulares demonstraram que hSCRT1 pode reprimir alvos comuns ativados por hASH1 (Nakakura et al., 2001a). Esse resultado pode ser explicado pela competição dessas proteínas pelos sítios de ligação E-box no DNA. Nesse cenário, as proteínas *Scrt* poderiam modular a função de Ash1 e outros fatores bHLH pró-neurais expressos durante a neurogênese.

Em conjunto, os trabalhos realizados com genes *Scrt* em vertebrados indicam que a função de promoção da neurogênese descrita em invertebrados foi conservada durante a evolução de Metazoa. hSCRT1 pode induzir a diferenciação neural e a expressão de *mScrt1* e *mScrt2* é exclusiva de tecidos neurais, exceto por algumas populações gliais. Alternativamente, a expressão significativa de *mScrt2* em algumas populações de células pós-mitóticas migratórias sugere uma função particular no momento de saída do ciclo celular e migração para os locais apropriados de diferenciação. Interessantemente, os membros da família Snail também estão envolvidos com a migração celular. Para determinar a exata função da família *Scrt* no complexo processo de neurogênese, análises funcionais diretas com genes *Scrt* durante a embriogênese de vertebrados são necessárias.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo dar continuidade à investigação da função de *Scrt* no desenvolvimento de vertebrados, através de estudos com *Scrt2* no embrião de galinha (*cScrt2*). Especificamente, abordaremos as seguintes questões:

- 1) Obtenção de um clone contendo a sequência codificante completa de *cScrt2*;
- 2) Análise da conservação da expressão dos genes *Scrt* em vertebrados através da caracterização do padrão de expressão temporal e espacial de *cScrt2* durante a embriogênese da medula espinhal e dos gânglios da raiz dorsal e comparação com os resultados previamente relatados em embriões de camundongos;
- 3) Análise do posicionamento de *cScrt2* dentro do programa de neurogênese baseado na comparação de seu padrão de expressão durante a embriogênese da medula espinhal com os padrões de expressão de fatores expressos em células-tronco neurais (*Notch1*) ou em neurônios diferenciados (*SCG10*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de embriões

Neste trabalho, utilizamos como modelo animal o embrião de galinha (*Gallus gallus*). Para a obtenção de embriões, ovos fertilizados obtidos em granjas locais (Granja Kunitomo, Mogi das Cruzes, SP e Granja Yamaguishi, São Paulo, SP) foram incubados a 37,5 °C e 40-60% de umidade relativa do ar. Para determinar o tempo de incubação necessário para a obtenção dos estágios de desenvolvimento desejados, foram utilizadas as padronizações HH (Hamburger e Hamilton, 1951) ou E (dias embriônicos).

Os embriões foram coletados para extração de RNA ou experimentos de hibridação *in situ*, exigindo assim medidas para evitar a degradação de RNA durante a coleta. Possíveis fontes de ribonuclease (RNase) foram descontaminadas anteriormente à coleta com os seguintes procedimentos:

- a) água e soluções foram tratadas com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% por 16-24 horas e em seguida esterilizadas em autoclave (ex.: água_{DEPC} e PBS_{DEPC});
- b) materiais de vidro e metal foram aquecidos a 200 °C por 4 horas;
- c) materiais de plástico foram tratados com uma solução de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos e em seguida lavados com água_{DEPC}.

Durante este trabalho, foram coletados embriões entre os estágios HH 8 (26 a 29 horas) e E6 (6 dias). O protocolo de coleta consiste em:

1. Quebrar o ovo em um prato sobre um fio de solução salina¹ para preservar a integridade da membrana vitelínica (gema).
2. *Embriões com até 3 dias*: aplicar um pequeno quadrado de papel-filtro perfurado centrando o orifício sobre o embrião (o orifício deve ser maior que o embrião), recortar ao redor do perímetro do papel com uma pequena tesoura e retirar o papel e o embrião aderido a ele com o auxílio de uma pinça.
Embriões com mais de 3 dias: recortar a membrana vitelínica ao redor do embrião com uma pequena tesoura e retirar o embrião com uma pequena colher perfurada.
3. Lavar o embrião três vezes por 5 minutos em PBS_{DEPC}².

¹ Salina: NaCl 0,9%.

3.2 Transcrição Reversa – Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)

As etapas de clonagem e os experimentos de análise do padrão temporal de expressão são baseados na amplificação da mensagem de transcritos por RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*). Essa técnica consiste na amplificação por PCR de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar (cDNA) sintetizadas *in vitro* por transcrição reversa (RT) de ácido ribonucleico (RNA). Esse procedimento pode ser dividido em três etapas: (1) extração de RNA total, (2) síntese de cDNA por RT e (3) amplificação do produto desejado por PCR.

3.2.1 Extração de RNA

O protocolo utilizado para extração de RNA total de embriões de galinha consiste em:

- 1) Retirar as membranas extra-embrionárias e homogeneizar os embriões em 0,5-1 ml de Trizol (Invitrogen), evitando que o volume da amostra seja maior que 10% do volume de Trizol.
 - 2) Incubar as amostras por 5 minutos em temperatura ambiente para dissociação de complexos nucleoprotéicos.
 - 3) Adicionar 0,2 ml de clorofórmio por 1 ml de Trizol utilizado na homogeneização, agitar fortemente com a mão e incubar por 3 minutos em temperatura ambiente.
 - 4) Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
 - 5) Transferir a fase líquida superior, que contém o RNA, para um novo tubo.
 - 6) Adicionar 0,5 ml de isopropanol por 1 ml de Trizol usado inicialmente e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente para precipitação do RNA.
 - 7) Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
 - 8) Retirar o supernadante, adicionar 1 ml de etanol 75% em água_{DEPC} por 1 ml de Trizol usado na homogeneização e vortexar.
 - 9) Centrifugar a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C.
 - 10) Secar ao ar por 5 minutos e ressuspender o precipitado em 25-100 µl de água ultrapura (Invitrogen) com uma micropipeta.
 - 11) Quantificar o RNA por espectrofotometria de massa.
 - 12) Estocar a -80 °C.
-

² PBS (Phosphate Buffered Saline): Na₂HPO₄ 0,61 g/L, NaCl 8 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, KCl 0,2 g/L; pH 7,2.

3.2.2 Síntese de cDNA

Anteriormente à síntese do cDNA, as amostras de RNA utilizadas para experimentos de comparação de expressão foram submetidas a digestão por desoxirribonuclease (DNase), para eliminar qualquer contaminação por DNA genômico na amostra de cDNA resultante. Para isso, foi utilizada a enzima DNase I (DNase I RNase-free, Fermentas). O protocolo utilizado para essa digestão consiste em:

- 1) Misturar em um tubo:

RNA	3,3 µg
Tampão de reação 10x com MgCl ₂	1 µl
Água ultrapura	até 9 µl
DNase I, RNase-free	1 µl (1 u)

- 2) Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- 3) Adicionar 1 µl de EDTA 25mM e incubar a 65 °C por 10 minutos para inativar a reação.

A reação de síntese de cDNA, chamada transcrição reversa (RT), consiste na produção *in vitro* de moléculas de DNA complementares às moléculas de RNA de uma amostra por uma enzima transcriptase reversa. Para síntese da amostra utilizada na clonagem da sequência completa de *cScrt2* foi utilizada a enzima Superscript II (Invitrogen), que tem atividade em temperaturas maiores e assim pode ser utilizada em condições que contribuem para a desnaturação de sequências de nucleotídeos ricas em GC. Para todas as outras amostras foi usada a enzima M-MLV (Invitrogen). Os fragmentos transcritos são determinados pelos primers presentes na reação. Para amostras usadas em clonagens foram utilizados primers randômicos (Random Primers, Promega) e para amostras usadas em experimentos de comparação de expressão foi utilizado oligo (dT) (Invitrogen), que parecia com a cauda poli(A) do RNA mensageiro (RNAm). O protocolo utilizado para a síntese de cDNA consiste em:

- 1) Misturar em um tubo:

Oligo (dT) ou primers randômicos	500 µg ou 50-250ng
RNA	3 µg
Mix de dNTPs (10 mM cada)	1 µl
Água ultrapura	até 12 µl

- 2) Aquecer a 65 °C e em seguida resfriar rapidamente no gelo.

- 3) Adicionar à mistura:

Tampão de reação 5x	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
Inibidor de RNase (Promega)	0,5 µl
Água ultrapura	0,5 µl

- 4) Incubar a 37 °C (M-MLV) ou 42 °C (Superscript II) por 2 minutos se usando oligo (dT) ou a 25 °C por 2 minutos se usando primers randômicos.
- 5) Adicionar 1 µl (200 unidades) de transcriptase reversa (M-MLV ou Superscript II); se usando primers randômicos, incubar a 25 °C por 10 minutos.
- 6) Incubar por 50 minutos a 37 °C (M-MLV) ou 42 °C (Superscript II).
- 7) Aquecer a 70 °C por 15 minutos para inativar a reação.
- 8) Estocar a -20 °C.

Especificamente para a síntese de cDNA do tipo RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), cujo objetivo é possibilitar a amplificação das extremidades de um transcrito, um protocolo diferente foi utilizado, onde amostras especiais de cDNA são sintetizadas para a clonagem das extremidades 5' e 3' separadamente. Para isso, utilizamos um kit de amplificação de cDNA RACE (SMART RACE cDNA Amplification kit; Clontech) e amostras de RNA de HH 19 e HH 23, onde análises preliminares indicaram maior quantidade de transcritos *cScrt2*. Na reação de síntese do cDNA 3', o primer 3'-CDS Primer A pareia com as caudas poli(A) do RNAm para iniciar a transcrição e ao mesmo tempo insere uma sequência universal (U) na extremidade 3' das moléculas de cDNA. Na reação de síntese do cDNA 5', o primer 5'-CDS Primer A pareia com as caudas poli(A) do RNAm para iniciar a transcrição, enquanto o primer SMART II A pareia com a sequência CCC deixada pela enzima M-MLV no final 5' das moléculas de cDNA e ao mesmo tempo insere a sequência U nesse local. Assim, a utilização de um primer universal, que pareia com a sequência U, combinado a um primer

antisenso (Rv) ou senso (Fw) específico permite a amplificação das extremidades 5' e 3' de um determinado transcrito, respectivamente, na reação de PCR subsequente. O protocolo usado para a síntese do cDNA RACE consiste em:

- 1) Adicionar em tubos separados:

cDNA 5'		cDNA 3'	
RNA	1 µg	RNA	1 µg
Primer 5'-CDS A	1 µl	Primer 3'-CDS A	1 µl
Oligo SMART II A	1 µl	Água ultrapura	até 5 µl
Água ultrapura	até 5 µl		

- 2) Incubar a 70 °C por 2 minutos.
 3) Resfriar os tubos no gelo por 2 minutos.
 4) Adicionar a cada reação:

Tampão de reação 5x	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
Mix de dNTPs (10 mM cada)	1 µl
Transcriptase reversa (M-MLV)	1 µl

- 5) Incubar a 42 °C por 1,5 horas.
 6) Diluir a reação em 100 µl de tampão Tricine-EDTA.
 7) Aquecer a 72 °C por 7 minutos.
 8) Estocar a -20 °C.

3.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Para as reações de RACE-PCR foi utilizado um kit específico (Advantage 2 PCR Kit, Clontech). Nessas reações, um primer gene-específico Rv ou Fw é combinado com o primer universal (ver seção 3.2.2) para amplificar as extremidade 5' ou 3' do cDNA, respectivamente. Para as reações de RT-PCR convencional foi utilizada a enzima Taq DNA Polymerase (Fermentas). Em todas as reações, os ciclos de PCR foram precedidos de um passo a 94 °C por 3 minutos, para desnaturar todas as moléculas de cDNA, e seguidos de um passo a 72 °C por 7 minutos, para garantir a extensão de todas as moléculas amplificadas. Essas reações são montadas da seguinte forma:

RACE-PCR		RT-PCR	
Água ultrapura	34,5 µl	Água ultrapura	16,8 µl
Tampão de PCR Advantage 2 10x	5 µl	Tampão para Taq com (NH ₄) ₂ SO ₄ 10x	2,5 µl
Mix de dNTPs (10 mM cada)	1 µl	Mix de dNTPs (10 mM cada)	0,5 µl
cDNA 5' ou 3'	2,5 µl	cDNA	1 µl
Primer universal 10x	5 µl	Primer Fw (10 µM)	1 µl
Primer específico Rv ou Fw (10 µM)	1 µl	Primer Rv (10 µM)	1 µl
Taq Polymerase Advantage 2 50x	1 µl	MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
		Taq Polymerase	0,2 µl

3.3 Clonagem

Anteriormente a esse trabalho, uma busca nas bases de dados do genoma de galinha do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul et al., 1990) por sequências de aminoácidos homólogas à do terceiro *zinc-finger* de Snail2 de galinha (CVCKICGKAFSRPWLLQGHIRTHTGEKP) retornou uma sequência parcial homóloga a Scrt2 (cScrt2; acesso XP_426994). Com base na sequência parcial do transcrito correspondente, com 707 pb (acesso XM_426994), os primers Fw1 e Rv1 foram desenhados e utilizados para a clonagem de um fragmento de 434 pb por PCR a partir de amostras de cDNA de HH 16-19. O clone obtido foi sequenciado e sua identidade confirmada (Anexo A). Pouco depois, o processo padrão de anotação do NCBI descontinuou as sequências genômica, transcrita e protéica relacionadas a cScrt2 da base de dados RefSeq.

Experimentos preliminares de comparação de expressão indicaram que a expressão de *cScrt2* no embrião aumentava significativamente após HH 23. A presença de quantidades expressivas do transcrito em uma amostra de cDNA facilita a amplificação de produtos específicos por PCR. Por esse motivo, utilizamos amostras de cDNA de HH 23 em todas as tentativas de clonagem.

3.3.1 RACE-PCR

Nas tentativas de amplificação da ponta 5' do transcrito *cScrt2* por RACE-PCR foram utilizados os primers Rv1, Rv3, Rv6 e Rv7, e da ponta 3' os primers Fw1, Fw2, Fw6 e Fw7

(Tabela 1; Fig. 6A), em reações montadas de acordo com o recomendado pelo kit utilizado (ver seção 3.2.3). Nas reações dos primers Rv1, Rv6, Rv7, Fw1, Fw6 e Fw7, que possuem temperatura de desnaturação menor que 70 °C (Tabela 1), foram realizados 25 ciclos (94 °C, 30 s; 68 °C, 30 s; 72 °C, 3 min). Com os primers Rv3 e Fw2, que possuem temperatura de desnaturação maior que 70 °C (Tabela 1), foram realizadas reações do tipo *touchdown* PCR, que utiliza altas temperaturas de anelamento de primers nos primeiros ciclos para aumentar a especificidade da reação e facilitar a amplificação do produto específico nos ciclos subsequentes. Consiste na realização de 5 ciclos iniciais com temperatura de anelamento de 72 °C (94 °C, 30 s; 72 °C, 3 min), 5 ciclos seguintes com diminuição para 70 °C (94 °C, 30 s; 70 °C, 30 s; 72 °C, 3 min) e 25 ciclos finais com diminuição para 68 °C (94 °C, 30 s; 68 °C, 30 s; 72 °C, 3 min).

3.3.2 Amplificação de fragmentos parciais de *cScrt2*

Além das clonagens que objetivavam a obtenção da sequência codificante completa, tencionávamos também a clonagem de fragmentos menores de *cScrt2* para utilizar como sondas nos experimentos de hibridação *in situ* e confirmar regiões adicionais da sequência de *cScrt2*. O par de primers Fw5/Rv5 (Tabela 1; Fig. 6A) foi utilizado para amplificar um fragmento de 204 pb (Fig. 6B; Anexo B) em PCR de 40 ciclos (94 °C, 30 s; 61 °C, 30 s; 72 °C, 2 min). O par de primers Fw7/Rv8 (Tabela 1; Fig. 6A) foi utilizado para amplificar um fragmento de 369 pb, contendo a extremidade 3' da sequência codificante (Fig. 6C; Anexo C), em PCR de 40 ciclos (94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 2 min).

Figura 6 - Primers utilizados e clonagens parciais. (A) Os primers utilizados e os fragmentos clonados são representados em relação à proteína prevista e seus domínios (SNAG, Scratch e *zinc-fingers*) e em relação à sequência do acesso XM_426994. (B-C) Eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio mostrando os fragmentos de 204 pb (B), amplificado com os primers Fw5/Rv5, e de 369 pb (C), amplificado com os primers Fw7/Rv8.

3.3.3 Amplificação da região 5' da sequência codificante de *cScrt2*

Como estratégia alternativa ao RACE-PCR para obtenção da sequência codificante completa de *cScrt2*, utilizamos um primer degenerado. Após a obtenção dos clones de 204 pb e 369 pb, desconhecíamos apenas a extremidade 5' da sequência codificante (Fig. 6A). O primer degenerado Fw4 foi desenhado com base no alinhamento da extremidade 5' da sequência codificante, que codifica o domínio SNAG, de outros ortólogos *Scrt* de vertebrados (Fig. 7). Esse primer foi combinado aos primers convencionais Rv6 ou Rv4 (Tabela 1; Fig. 6A) em PCR de 40 ciclos (94 °C, 45 s; 51 °C, 50 s; 72 °C, 4 min) para a amplificação de fragmentos de 320 pb e 323 pb, respectivamente, ambos contendo a extremidade 5' da sequência codificante de *cScrt2* (Anexos D-E).

		1.....10.....18
<i>Mus musculus</i>	<i>scrt2</i>	ATGCCGCGTTCCTTCCTG
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>scrt2</i>	ATGCCGCGTTCCTTCCTG
<i>Homo sapiens</i>	<i>scrt2</i>	ATGCCGCGTTCCTTCCTG
<i>Macaca mulata</i>	<i>scrt2</i>	ATGCCGCGTTCCTTCCTG
<i>Mus musculus</i>	<i>scrt1</i>	ATGCCAGGTCCTTCCTG
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>scrt1</i>	ATGCCAGGTCCTTCCTG
<i>Homo sapiens</i>	<i>scrt1</i>	ATGCCAGGTCCTTCCTG
<i>Pan troglodytes</i>	<i>scrt1</i>	ATGCCAGGTCCTTCCTG
<i>Canis familiaris</i>	<i>scrt1</i>	ATGCCAGGTCCTTCCTG
	identidades	***** * *****
	Primer degenerado Fw4	ATGCCNMGN ^T CCTTCCTG
	Domínio SNAG	M P R S F L

Figura 7 - O primer degenerado Fw4. Alinhamento da extremidade 5' da sequência codificante de ortólogos *Scrt* de vertebrados usado para o desenho do primer degenerado Fw4. N: A, C, G, ou T; M: A ou C.

3.3.4 Amplificação da sequência codificante completa de *cScrt2*

Com o conhecimento da sequência 5', foi possível desenhar o primer Fw8 (Tabela 1), para ser combinado ao primer Rv8 (Tabela 1; Fig. 6A) nas tentativas de amplificação da sequência codificante completa. Considerando o objetivo final de subclonar a sequência completa para o vetor de expressão pMES-GFP (Swartz et al., 2001), foram desenhados também os primers EcoRI-Fw8 e SmaI-Rv8 (Tabela 1), onde sítios de restrição para as enzimas EcoRI (GAATTC) e SmaI (CCCGGG) foram inseridos para flanquear o produto de PCR. O par de primers EcoRI-Fw8/SmaI-Rv8 foi utilizado em PCR de 40 ciclos (94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 4 min) para amplificar o produto esperado de 851 pb, contendo a sequência codificante completa flanqueada pelos sítios de restrição EcoRI e SmaI nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

Tabela 1 - Primers utilizados. Posição: região da sequência codificante correspondente ao primer; T_m: temperatura de desnaturação em condições padrão.

Primer	Sequência	Posição	T _m (°C)
Fw1	ACT CCA TGG ACG CCT TCT TCA TCA	305-328	60,2
Rv1	GCA CTG CTT GCA CTT GTA GTG CTT	738-715	60,4
Fw2	CTG CTG CAG GGC CAC ATG CGT TCG CAC A	595-622	70,1
Rv3	GCC GGC TGA GGT TGG AGG AGG TGG CGT A	436-409	70,3
Fw4	ATG CCN MGN TCC TTC CTG	1-18	50,7-61,1
Rv4	AAG AAG GCG TCC ATG GAG TA	323-304	55,8
Fw5	GGA GGA GTA CAG CGA TCC CGA GAG	222-245	62,1
Rv5	TTG GAG GAG GTG GCG TAG GTC TT	425-403	61,9
Fw6	TGA CGG ACA GCT ACT CCA TGG ACG CCT T	293-320	66,1
Rv6	AAG GCG TCC ATG GAG TAG CTG TCC GTC A	320-293	66,1
Fw7	AGC AAG ATG GCC AGG AAG TGC CCG ACC T	463-490	68,6
Rv7	AGG TCG GGC ACT TCC TGG CCA TCT TGC T	490-463	68,6
Fw8	ATG CCA AGG TCC TTC CTG GT	1-20	58,9
Rv8	CTA GTT CCC TAT TGC ACA GCT GTG TTC	831-805	59,2
<u>EcoRI-Fw8</u>	<u>GGA ATT CCA</u> TGC CAA GGT CCT TCC TGG T	1-20	58,9
<u>SmaI-Rv8</u>	<u>TCC CCC GGG GGA</u> CTA GTT CCC TAT TGC ACA GCT GTG TTC	831-805	59,2
Fw10	CAC GTC CTC ACC CAC AAC CT	529-548	59,6
Rv10	TTC GGA GCC CTT GAA GCA	807-790	56,9

3.3.5 Clonagem dos produtos de PCR

Em primeiro lugar, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% + brometo de etídio 1:20.000 em tampão TAE³ com corrente elétrica de 110 V, para separação dos produtos amplificados. Para determinação aproximada do tamanho dos fragmentos amplificados, amostras de tamanhos conhecidos (1kb DNA Ladder, Invitrogen) foram aplicadas ao lado dos produtos de PCR durante a eletroforese. Em seguida, as bandas correspondentes aos produtos com tamanho desejado foram extraídas com um kit de extração de gel (GenElute Gel Extraction Kit, Sigma). Na eluição final da purificação foi utilizado o volume mínimo de água recomendado pelo kit (25 µl), para maximizar a concentração de DNA na solução final.

³ TAE (Tris-Acetato-EDTA): Tris-base (Sigma) 4,84 g/L, ácido acético glacial (Sigma) 1,09 g/L, EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, Sigma) 0,292 g/L.

Para clonagem dos fragmentos purificados, foi utilizado um kit de clonagem para produtos de PCR (pGEM-T Vector System, Promega). As reações de ligação foram montadas com a máxima quantidade de inserto possível (3 µl da solução de DNA obtida após a extração do gel de agarose). As ligações foram realizadas por 20-24 horas a 16 °C. Em seguida, bactérias competentes *Escherichia coli* foram transformadas por cloreto de cálcio com as reações de ligação e plaqueadas em meio LB-agar⁴ com o antibiótico ampicilina, cujo gene de resistência está presente no vetor pGEM-T e que, por esse motivo, é usado para a seleção de bactérias transformadas. As placas foram incubadas por 18-22 horas a 37 °C para a obtenção de colônias resistentes ao antibiótico, contendo os plasmídeos produzidos pela reação de ligação.

Para confirmação da identidade dos clones obtidos, inicialmente colônias individuais foram cultivadas em 3 ml de meio LB líquido⁵ por 18-22 horas a 37 °C em agitador com rotação de 200 rpm. Os clones de DNA foram extraídos das culturas pelo método de lise alcalina (Birnboim e Doly, 1979) em protocolos padrão (Maniatis et al., 1982) ou com kits de isolamento de DNA de amostras pequenas (Miniprep) com colunas (PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen; GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas). Os clones purificados foram testados em reações de PCR com os primers que amplificaram o inserto e com os primers T7 e SP6, cujas sequências flanqueiam o inserto no vetor pGEM-T; os clones positivos em ambas as reações foram sequenciados para confirmação (Anexo A-E). As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas com um kit de sequenciamento (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e analisadas pelo sistema MegaBace 1000 (GE). Para amplificação em maior escala dos clones desejados, os clones bacterianos correspondentes foram cultivados em 100 ml de meio LB líquido por 18-22 horas a 37 °C em agitador com rotação de 200 rpm e o DNA foi purificado das culturas com um kit de isolamento de DNA de amostras médias (PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen).

⁴ LB-agar: LB Broth Base (Invitrogen) 2%, Select Agar (Invitrogen) 0,07%, ampicilina 1:1000.

⁵ LB líquido: LB Broth Base (Invitrogen) 2%, ampicilina 1:1000.

3.3.6 Subclonagem do clone completo de *cScrt2* para o vetor de expressão *pMES-GFP*

Para possibilitar ensaios funcionais com *cScrt2*, o inserto contendo a sequência codificante completa foi transferido do vetor de clonagem pGEM-T para o vetor de expressão pMES-GFP (Swartz et al., 2001). Em primeiro lugar, o plasmídeo pGEM-T(*cScrt2*) e o vetor pMES-GFP foram digeridos com as enzimas *Sma*I e *Eco*RI (Fermentas). Após isso, as extremidades do vetor pMES-GFP linearizado foram desfosforiladas com uma enzima fosfatase alcalina (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Fermentas), para possibilitar uma ligação eficiente com o inserto. Os produtos dessas reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e as bandas desejadas (*cScrt2* e pMES-GFP) foram extraídas e purificadas, como descrito na seção 3.3.5. Para a reação de ligação vetor-inserto, utilizamos a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas) em reações de ligação padrão a 16 °C por 20-24 horas. Em seguida, os produtos da reação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* pelo método do cloreto de cálcio e as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina, cujo gene de resistência também está presente no vetor pMES-GFP. Algumas colônias resistentes foram cultivadas em amostras pequenas, o DNA dessas culturas foi extraído com um kit de Miniprep (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) e a identidade dos clones foi confirmada com reações de PCR contendo os primers Fw8 e Rv8 (Tabela 1). Dois dos clones obtidos foram sequenciados (ver Seção 3.3.5; ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer, Hitachi) e confirmados (Anexo F). Em seguida, os clones bacterianos correspondentes foram cultivados em 100 ml de meio LB líquido e o DNA das culturas foi extraído com um kit de Midiprep (PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen).

3.4 Construção da árvore filogenética

As sequências protéicas dos ortólogos *Homo sapiens* SCRT1 (NP_112599) e SCRT2 (NP_149120), *Mus musculus* Scrt1 (NP_570963) e Scrt2 (XP_619828), *Rattus norvegicus* Scrt1 (XP_345849) e Scrt2 (XP_345456), *Danio rerio* Scrt (NP_998802) e *Branchiostoma floridae* Scrt (XP_002230176) foram alinhadas com o produto previsto da tradução de nosso clone completo no software ClustalX2 (Larkin et al., 2007). A árvore filogenética foi gerada a partir desse alinhamento pelo método Neighbor-Joining, executado pelo software ClustalX2, e visualizada com o software TreeView (Page, 1996). Na árvore resultante, os valores bootstrap se referem aos nós e estão expressos em escala de 0-100.

3.5 Análise temporal de expressão (PCR)

3.5.1 PCR semi-quantitativo

Para a análise semi-quantitativa, o fragmento de 434 pb foi amplificado em PCR de 30 ciclos (94 °C, 45 s; 57 °C, 45 s; 72 °C, 3 min) com os primers Fw1/Rv1 (Tabela 1, Fig. 6A) a partir de amostras de cDNA dos estágios HH 9-11, HH 13-14, HH 15-16, HH 18-19 e HH 21-23. Primers específicos para β -actina (β actinF:taaggatctgtatgccaacacagt e β actinR:acaatggagggtccggattcat) foram usados em reações de controle endógeno. Os produtos do PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose, como descrito na seção 3.3.5, e as imagens foram capturadas com o sistema FOTO/Analyst Archiver (FotoDyne).

3.5.2 PCR quantitativo

Para a análise quantitativa, um fragmento de 379 pb foi amplificado em PCR de 40 ciclos (94 °C, 15 s; 60 °C, 25 s; 72 °C, 30 s) com os primers Fw10/Rv10 (Tabela 1) a partir de duas amostras distintas dos estágios HH 8-10, HH 12-13, HH 15-16, HH 18, HH 20, HH 22, HH 24 e HH 26. As reações de PCR foram realizadas em duplicatas de 10 μ l contendo cada primer na concentração de 300 nM, 25 ng de cDNA e 50% de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para análise da amplificação em tempo real foi utilizado o sistema 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Primers específicos para β -actina (β actinF:taaggatctgtatgccaacacagt e β actinR:acaatggagggtccggattcat) foram usados em reações de controle endógeno. O método de Ct comparativo foi utilizado para a quantificação da expressão de *cScrt2* em relação à expressão de β -actina em cada amostra. Para a construção do gráfico foi calculada a relação entre os valores de expressão de cada amostra e o valor da amostra inicial (HH 8-10).

3.6 Hibridação *in situ*

A introdução de RNases em qualquer momento de um experimento de hibridação, desde a coleta até a formação do híbrido de RNA endógeno/sonda, pode ser a causa de um sinal ausente ou fraco. Para evitar isso, possíveis fontes de RNase foram descontaminadas como descrito na seção 3.1.

3.6.1 Transcrição da sonda

Para transcrição da sonda de RNA, em primeiro lugar os plasmídeos contendo os fragmentos de cDNA foram linearizados em reação de digestão com enzimas de restrição. Para síntese das sondas antisenso *cSrt2*, *cNotch1* e *cSCG10*, os plasmídeos pGEM-T(*cSrt2*-323pb), pAD-Gal4(*cNotch1*) e pGEM3Z(*cSCG10*) (doações do Dr. Panagiotis Politis) foram linearizados com as enzimas NotI (Fermentas), HindIII (New England BioLabs) e EcoRI (Fermentas), respectivamente, cujos sítios de restrição são próximos às extremidades 5' dos insertos. Para síntese da sonda *cSrt2* senso (controle negativo), o plasmídeo pGEM-T(*cSrt2*-204pb) foi linearizado com a sonda NotI (Fermentas), cujo sítio de restrição é próximo à extremidade 3' do inserto. O protocolo utilizado para preparação do plasmídeo linearizado consiste em:

-
- 1) Linearizar 10 µg do plasmídeo contendo a sonda com a enzima de restrição apropriada por 4-16 horas.
 - 2) Correr 0,5 µg do DNA linearizado em gel de agarose para checar a digestão.
 - 3) Adicionar 20 µl de NaOAc⁶_{DEPC} 3 M.
 - 4) Completar o volume total até 200 µl com água ultrapura.
 - 5) Adicionar 200 µl de fenol:clorofórmio 1:1.
 - 6) Vortexar e centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos.
 - 7) Transferir o sobrenadante para um tubo novo.
 - 8) Adicionar 500 µl de etanol (Merck) e vortexar.
 - 9) Precipitar por 20-24 horas a -20 °C.
 - 10) Centrifugar por 15 minutos em velocidade máxima a 4 °C.
 - 11) Retirar o sobrenadante e adicionar 150 µl de etanol 70% em água_{DEPC}.
 - 12) Vortexar e centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima.
 - 13) Retirar o sobrenadante e secar o precipitado ao ar a 37 °C.
 - 14) Ressuspender em 10 µl de água ultrapura e deixar dissolver a 37 °C por 15 minutos.
 - 15) Quantificar o DNA por espectrofotometria de massa e guardar a -20 °C.
-

Em seguida, as sondas de RNA foram transcritas *in vitro* a partir dos plasmídeos linearizados. Para a transcrição de todas as sondas foi utilizada a enzima T7 RNA Polymerase (Roche), cujo promotor está próximo à extremidade 3' das sondas *cSrt2*(323pb), *cNotch1* e

⁶ NaOAc: Acetato de sódio (Sigma).

cSCG10 e da extremidade 5' da sonda *cScrt2(204pb)*. As sondas foram transcritas na presença de nucleotídeos marcados com o epítipo digoxigenina (DIG), para localização dos híbridos de RNA após a hibridação *in situ* com anticorpos anti-DIG. O protocolo utilizado para transcrição *in vitro* e purificação das sondas de RNA consiste em:

1) Misturar em um tubo:

Plasmídeo linearizado	1 µg
Tampão de transcrição 10x	3 µl
DTT (0,1 M)	3 µl
Mix de DIG-ntp (Roche)	2 µl
Inibidor de RNase (Promega)	0,75 µl (30 U)
T7 RNA polimerase	2 µl
Água ultrapura	até 30 µl

- 2) Incubar por 2 horas a 37 °C.
- 3) Adicionar 10 µl de solução contendo 1 µl de tampão de transcrição 10x e 1 µl de DNase I RNase-free (Fermentas) para digerir o DNA.
- 4) Misturar e incubar por 30 minutos a 37 °C.
- 5) Correr 1/20 da reação em gel de agarose para checar a transcrição.
- 6) Levar o volume a 82 µl com água ultrapura, adicionar 8 µl de EDTA 1 M e misturar.
- 7) Adicionar 10 µl de LiCl_{DEPC} 4 M e 250 µl de etanol e vortexar.
- 8) Precipitar por 20-24 horas a -20 °C.
- 9) Centrifugar por 15 minutos em velocidade máxima a 4 °C.
- 10) Retirar o sobrenadante e adicionar 300 µl de etanol 70% em água_{DEPC}.
- 11) Vortexar bem e centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima a 4 °C.
- 12) Retirar o sobrenadante e enxaguar o precipitado com 30 µl de etanol.
- 13) Secar ao ar por 5 minutos a 37 °C.
- 14) Ressuspender em 20 µl de água ultrapura e deixar dissolver a 37 °C por 15 minutos.
- 15) Guardar a -80 °C.

3.6.2 Fixação do material

Para experimentos de hibridação *in situ*, foram coletados embriões entre E1 e E6. Esses embriões foram fixados em PFA (Paraformaldeído, Sigma) 4% em PBS a 4 °C por 20-24 horas (E1-E4) ou 36-48 horas (E5-E6). Em seguida, foram retiradas as membranas extra-

embrionárias e os embriões usados em procedimento com embriões inteiros tiveram o tubo neural perfurado algumas vezes com uma agulha de acupuntura. Os embriões foram então desidratados em série de metanol (Merck) 25%, 50% e 75% em PBST⁷_{DEPC} por 10 minutos cada seguida de uma lavagem de 10 minutos em metanol e estocagem em metanol a -20 °C.

3.6.3 Procedimento para embriões inteiros

Embriões entre HH 8-10 foram utilizados em experimentos de hibridação *in situ* com embriões inteiros. As imagens foram capturadas com uma câmera Nikon DS-SMc acoplada a um estereomicroscópio Nikon C-BD115. O protocolo usado para hibridação consiste em:

- 1) Reidratar em série de metanol 75%, 50% e 25% em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC}⁸ por 5 minutos cada, agitando, e lavar duas vezes por 5 minutos em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC}, agitando.
- 2) Descorar com H₂O₂ 6% em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC} por 1 hora, agitando, no escuro (embrulhar em papel alumínio).
- 3) Lavar três vezes por 5 minutos em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC}, agitando.
- 4) Tratar com Proteinase K 10 µg/ml em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC} por 15 minutos, sem agitar.
- 5) Lavar em glicina 2 mg/ml em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC} por 10 minutos, sem agitar.
- 6) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC}, sem agitar.
- 7) Pós-fixar em PFA 4% + Glutaraldeído 0,2% em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC} por 20 minutos, sem agitar.
- 8) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBST_{(Mg/CaCl₂)DEPC}, agitando.
- 9) Incubar em solução de pré-hibridação para embriões inteiros [formamida 50%, SSC⁹ (pH 4,5) 5x, RNA de levedura (Roche) 1 mg/ml, heparina 0,1 mg/ml, Denhardt's¹⁰ 1x, Tween-20 0,1%, CHAPS (Sigma) 1 mg/ml, EDTA 10 mM, água_{DEPC}] fresca por 1-2 horas a 65 °C, agitando.
- 10) Transferir os embriões para solução de hibridação (solução de pré-hibridação com sonda diluída a 2 µg/ml) e hibridar por 16-20 horas a 70 °C, agitando.
- 11) Lavar três vezes por 40 minutos com solução I¹¹ pré-aquecida a 70 °C, agitando.
- 12) Lavar três vezes por 30 minutos com solução II¹² pré-aquecida a 70 °C, agitando.

⁷ PBST: Tween-20 (Sigma) 0,1% em PBS.

⁸ PBST_(Mg/CaCl₂): PBST, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,9 mM.

⁹ SSC (Saline-Sodium Citrate) 20x: NaCl 175 g/L, citrato de sódio 88,2 g/L.

¹⁰ Denhardt's 100x: Ficoll-400 0,02 g/ml, Polyvinilpyrrolidone 0,02 g/ml, BSA (fr V) 0,02 g/ml, água_{DEPC}.

¹¹ Solução I: formamida 50%, SSC (pH4,5) 4x, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 1%, água_{DEPC}.

¹² Solução II: formamida 50%, SSC (pH4,5) 2x, SDS 0,2%, água_{DEPC}.

- 13) Lavar três vezes por 5 minutos em MAB_{Lev,Tw}¹³, agitando.
 - 14) Pré-bloquear os embriões em MAB_{Lev,Tw} + BMB¹⁴ 2% + NSS (Normal Sheep Serum, Jackson ImmunoResearch) 10% (aquecer a solução um pouco para diluir) por 3 horas, agitando.
 - 15) Pré-absorver o anticorpo durante o bloqueio dos embriões:
 - a. Colocar 3 mg de pó de embrião em um tubo eppendorf.
 - b. Adicionar 0,5 ml de MAB_{Lev,Tw} + BMB 2% e incubar por 30 minutos a 70 °C.
 - c. Vortexar por 5 minutos.
 - d. Resfriar em gelo e adicionar 5 µl de NSS e 3 µl de anticorpo anti-DIG (Roche).
 - e. Deixar agitando por 1 hora a 4 °C.
 - f. Centrifugar em velocidade máxima por 10 minutos a 4 °C.
 - g. Coletar o supernadante em um tubo eppendorf.
 - h. Diluir o supernadante com MAB_{Lev,Tw} + BMB 2% + NSS 1% até 1,5 ml (mix de anticorpo).
 - i. Guardar a 4 °C.
 - 16) Transferir os embriões para o mix de anticorpo e deixar por 16-20 horas a 4 °C, agitando.
 - 17) Lavar três vezes por 5 minutos em MAB_{Lev,Tw}, agitando.
 - 18) Lavar cinco vezes por 1-1,5 horas em MAB_{Lev,Tw}, agitando.
 - 19) Lavar em MAB_{Lev,Tw} por 16-20 horas a 4 °C, agitando.
 - 20) Repetir os passos 17-19.
 - 21) Lavar três vezes por 10 minutos em NTMT¹⁵, agitando.
 - 22) Incubar em BM Purple + Tetramisole 2mM + Tween-20 0,1%, no escuro (embrulhar em papel alumínio) a 4 °C até revelação do sinal.
 - 23) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBS.
 - 24) Fixar em PFA 4% em PBS por 1 hora.
 - 25) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBS e guardar em PBS a 4 °C.
-

3.6.4 Procedimento para cortes histológicos

Os embriões seccionados foram inicialmente incluídos em parafina. Para isso, embriões E2-E4 já desidratados foram parafinizados passando três vezes por 20 minutos em xilol e três vezes por 20 minutos em parafina a 60 °C. Embriões maiores (E5-E6) foram

¹³ MAB_{Lev,Tw} (Maleic Acid Buffer): ácido maléico 11,6 g/L, NaCl 8,76 g/L, (pH7,5) [adicionar no dia: Tetramisole (Sigma) 2mM e Tween-20 0,1% (não autoclavar)].

¹⁴ Boehringer Blocking Reagent (Boehringer) 10% em MAB.

¹⁵ NTMT: MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, Tris (pH 9,5) 100 mM.

parafinizados com 30 minutos em xilol:metanol 1:1, três vezes por 30 minutos em xilol, 30 minutos em xilol:parafina 1:1 a 60 °C e três vezes por 30 minutos em parafina a 60 °C. Depois de solidificado e esfriado o bloco de inclusão, o material foi seccionado em cortes de 10 µm com um micrótomo. Os cortes foram coletados em água_{DEPC} com lâminas carregadas (Fisherbrand Superfrost Plus Microscope Slides, Fisher Scientific). As lâminas foram secas a 37 °C por 1-2 dias e utilizadas imediatamente em seguida para hibridação *in situ*. As imagens foram capturadas com uma câmera Nikon DXM1200C acoplada a um microscópio Nikon E800. O protocolo usado para hibridação consiste em:

- 1) Reidratar em série de banhos de xilol duas vezes por 10 minutos, etanol por 5 minutos, etanol 95%, 70% e 30% em água_{DEPC} por 5 minutos cada, água_{DEPC} por 5 minutos e PBS_{DEPC} duas vezes por 5 minutos.
- 2) Permeabilizar com Triton X-100 (Sigma) 0,3% em PBS por 15 minutos.
- 3) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBS_{DEPC}.
- 4) Incubar com Proteinase K (Roche) 5 µg/ml em TE¹⁶ a 37 °C por 30 minutos.
- 5) Enxaguar em PBS_{DEPC}.
- 6) Pós-fixar em PFA 4% em PBS_{DEPC} a 4 °C por 5 minutos.
- 7) Lavar duas vezes por 5 minutos em PBS_{DEPC}.
- 8) Acetilar com anidrido acético 0,25% em TEA (Trietanolamina, Sigma) 0,1 M por 10 minutos.
- 9) Lavar três vezes por 3 minutos em PBS_{DEPC}.
- 10) Pré-hibridar em solução de pré-hibridação para cortes [formamida 50% + SSC (pH 7,5) 5x + Denhardt's 5x + RNA de levedura 250 µg/ml + DNA de esperma de salmão 500µg/ml] por 20-24 horas.
- 11) Hibridar com a sonda diluída a 400 ng/ml em solução de pré-hibridação para cortes a 72 °C por 20-24 horas, com as lâminas cobertas por HybSlips (Electron Microscopy Sciences).
- 12) Mergulhar os cortes por 5 minutos em SSC (pH 7,5) 5x a 72 °C para retirar os HybSlips sem aplicação de força.
- 13) Lavar em SSC (pH 7,5) 0,2x a 72 °C duas vezes por 1 hora.
- 14) Lavar por 5 minutos em MAB.
- 15) Bloquear com BMB¹⁷ 1% em MAB¹⁸ por 1 hora.

¹⁶ TE (Tris-EDTA): 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA.

¹⁷ BMB: Boehringer Blocking Reagent (Boehringer) 10% em MAB.

¹⁸ MAB (Maleic Acid Buffer): ácido maléico 11,6 g/L, NaCl 8,76 g/L; pH7,5.

- 16) Incubar com anticorpo anti-DIG (Roche) 1:5000 em solução de bloqueio a 4 °C por 20-24 horas.
 - 17) Lavar três vezes por 10 minutos em MAB.
 - 18) Lavar por 5 minutos em NTMT¹⁹.
 - 19) Revelar com NBT-BCIP (nitro blue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) diluído em NTMT por 2-6 horas.
 - 20) Montar as lâminas em glicerol 50% em PBS e fechar com esmalte.
-

¹⁹ NTMT: MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, Tris (pH 9,5) 100 mM.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem da sequência codificante de cScrt2

4.1.1 Clonagem

Ao início deste trabalho, nosso laboratório já havia clonado e sequenciado um fragmento interno de 434 pb de um homólogo de *Scrt* em galinha, identificado inicialmente no acesso XM_426994 da base de dados do genoma da galinha do NCBI. A sequência do NCBI possuía 707 pb e codificava apenas a região C-terminal, incluindo o códon de parada, de um possível ortólogo de *Scrt2* (Fig. 6A). Para obtenção da sequência codificante completa, objetivo principal dessa etapa do trabalho, ainda era necessário o conhecimento da região que codificava a porção N-terminal de cScrt2, incluindo o códon de início de tradução. Em um primeiro momento, realizamos tentativas de clonagem das porções 5' e 3' desse transcrito, incluindo as regiões não-traduzidas, por RACE-PCR, objetivando a identificação da sequência codificante completa para uma clonagem subsequente. No entanto, não obtivemos sucesso com esta estratégia.

Desta forma, adotamos uma nova estratégia, baseada no uso de um primer degenerado. Com poucas exceções dentro da superfamília Snail, a região de início de tradução desses fatores de transcrição codifica o domínio SNAG (Nieto, 2002). Supondo que cScrt2 mantém essa característica, desenhamos um primer degenerado (Fw4) com base na sequência consenso resultante do alinhamento das extremidades 5' das sequências codificantes de diferentes ortólogos *Scrt* em vertebrados (Fig. 7).

A presença de bases variáveis em primers degenerados aumenta a probabilidade de amplificação de produtos inespecíficos na PCR. Além disso, não sabíamos ao certo qual o tamanho total da sequência codificante de cScrt2, o que dificultaria a identificação dos produtos específicos por uma simples eletroforese. Para contornar essas dificuldades, realizamos um experimento onde combinamos o primer degenerado Fw4 com diferentes primers Rv em reações separadas. Apesar de não sabermos o tamanho esperado para os produtos específicos de cada reação, esses fragmentos deveriam apresentar entre si diferenças de tamanho iguais às distâncias, dentro da sequência de cScrt2, entre os primers

Rv usados para amplificá-los, as quais eram conhecidas (Fig. 6A). No gel resultante desse experimento, onde as amostras foram ordenadas crescentemente da esquerda para a direita de acordo com os tamanhos esperados para os produtos específicos de cada reação, pudemos identificar um grupo de bandas em padrão de escada, exatamente como era esperado (Fig. 8). Os produtos candidatos obtidos nas reações com os primers Rv6, Rv4, Rv5 e Rv7 (Fig. 8, em vermelho) foram clonados e sequenciados, confirmando que os fragmentos obtidos com os primers Rv6, com 320 pb, e Rv4, com 323 pb, continham a extremidade 5' da sequência codificante de *cScrt2* (Anexos D-E). A informação de sequência obtida com essas clonagens possibilitou o desenho do primer Fw8, específico para a extremidade 5' da sequência codificante de *cScrt2*, incluindo o códon de início de tradução. Esses primer, combinado ao primer Rv8, que inclui o códon de parada, possibilitou a amplificação de um produto de 831 pb contendo a sequência codificante completa. Além disso, os primers EcoRI-Fw8 e SmaI-Rv8 foram desenhados para amplificar um produto de 851 pb contendo a sequência completa flanqueada pelos sítios de restrição EcoRI e SmaI nas extremidades 5' e 3', respectivamente (Fig. 9; Anexo F). Esse último produto foi clonado no vetor pGEM-T e então transferido direcionalmente para o vetor de expressão pMES-GFP.

A clonagem da sequência codificante completa de *cScrt2* no vetor pMES-GFP foi um importante objetivo alcançado durante este trabalho. Até o momento, não existem na literatura trabalhos que realizaram análises funcionais diretas da função de Scrt em embriões de vertebrados. A construção final produzida pMES-GFP(*cScrt2*) possibilitará futuros experimentos de superexpressão durante a embriogênese de galinha para a investigação da função da família Scrt em vertebrados.

Figura 8 - Clonagem da região 5' de *cScrt2*. No esquema, primers Rv combinados com Fw4 são representados em relação às sequências do NCBI e da proteína *cScrt2*. Acima, gel após eletroforese das diferentes reações de amplificação, com os produtos clonados em destaque (linha vermelha).

Figura 9 - Clonagem da sequência completa de *cScrt2*. No esquema, primers utilizados na clonagem e sítios de restrição inseridos nas pontas 5' e 3'. Acima, gel após eletroforese da reação de amplificação mostrando o produto de 851 pb, que contém a sequência codificante completa flanqueada pelos sítios de restrição EcoRI e SmaI.

4.1.2 Tradução prevista

O clone obtido codifica uma proteína de 276 aminoácidos. Todos os domínios esperados para cSrt2 foram identificados e delimitados com base em consensos previamente publicados (Fig. 10; Nieto, 2002). A sequência completa possui identidade de 70% com Srt2 de rato, 68% com SCRT2 humano e 58% com Srt2 de zebrafish (Fig. 11). O domínio SNAG é totalmente conservado, enquanto o domínio Scratch compartilha identidade de 95% com ortólogos Srt2 de mamíferos e a região dos *zinc-fingers* compartilha identidades de 89% com Srt2 de rato, 90% com SCRT2 humano e 81% com Srt2 de *Drosophila* (Fig. 11 e dados não mostrados).

Figura 10 - A proteína cSrt2. (A) Consensos dos domínios de Srt2 de amniotos (Nieto, 2002). (B) Sequência codificante de cSrt2 e sua tradução prevista, com os domínios esperados delimitados: SNAG (vermelho), Scratch (verde) e cinco *zinc-fingers* (amarelo); abaixo, esquema mostrando as posições relativas dos domínios dentro da sequência de aminoácidos. Zf: *zinc-finger*.

Figura 11 - Homologia de cSrt2. Alinhamento da sequência de aminoácidos de cSrt2 com a dos ortólogos Srt2 de zebrafish (*Danio rerio*), Srt2 de rato (*Rattus norvegicus*) e Srt2 humano (*Homo sapiens*).

Buscando mais informações acerca das características de cSrt2, submetemos sua sequência de aminoácidos a um programa de análise de potenciais sítios de fosforilação (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/predict.php>). O resultado desta análise sugere que, entre outros, os resíduos tirosina₇₇ (Y), serina₇₈ (S) e serina₈₂ são possíveis alvos de fosforilação de diferentes tirosina quinases ou serina/treonina quinases, respectivamente (Fig. 12). A sequência que contém estes resíduos (EEYSDPESP) é completamente conservada entre os ortólogos Srt2 de mamíferos (Fig. 11). Além disso, a serina₇₈ está conservada como serina ou treonina em proteínas Snail1 e Snail2 e, em Srt2 de *Drosophila* (dSrt2), o resíduo equivalente está posicionado em um domínio rico em serina (dados não mostrados). Os outros potenciais resíduos fosforiláveis são serina₁₂₉, treonina₁₃₉ (T), treonina₁₄₉ e tirosina₁₆₈, todos localizados na região dos *zinc-fingers* (Fig. 12).

A análise funcional dos domínios de hSRT1 revelou que sua atividade de repressão de transcrição está concentrada entre os 40 aminoácidos N-terminais e a região dos *zinc-fingers* (Nakakura et al., 2001a). Essa região equivale aos resíduos 44-127 de cSrt2 (Fig. 12). Além disso, em hSRT1 a região importante para a localização nuclear está nos *zinc-fingers* (Fig. 12; Nakakura et al., 2001a). Nas proteínas Snail, a região amino-terminal contém um sinal de exportação nuclear e um domínio rico em serina. A fosforilação deste último aumenta a eficiência de translocação de Snail para o citoplasma e diminui a sua capacidade de repressão de transcrição (Domínguez et al., 2003). Essa região equivale aos resíduos 10-85 de cSrt2 (Fig. 12).

A

MPRSFLVKKL	KADAFPLAGA	PAPPYAPLEP	PYALPGPAAG	DGYLQHCLAP	AGYNPDKKQG	LPPAPDPDPAY	70	
APGQEEYSDP	ESPOSTFSAR	YFNGEAAVTD	SYSMDAFFIT	DGRSRRRGES	QRRGSHRHSC	PECCKTYATs	140	
-----Y--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		Src
-----Y--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		INSR
-----Y--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		Syk
-----Y--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		Other MDD
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		CKII
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		CKI
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		ATM
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		ATM
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		IKK
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----		Other MDD
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----S-	-----		IKK
-----S--	-----	-----	-----	-----	-----	-----T-		PKA
SNLSRHKQTH	RSLDSKMARK	CPTCGKAYVS	MPALAMHVLT	HNLKHKCDVC	GKAFSRPWLL	QGHMRSHTGE	210	
-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----		PKA
-----T-	-----	-----Y--	-----	-----	-----	-----		INSR
KPFGCSHCGK	AFADRSNLRA	HMOTHSFAFKH	YKCKOCEKTF	ALKSYLNKHY	ESACFKGSEH	SCAIGN-	276	

B

Figura 12 - Potenciais sítios de fosforilação em cSrt2. (A) Resultado da análise de possíveis sítios de fosforilação de cSrt2 e as possíveis quinases mediadoras. (B) Esquema mostrando a posição dos potenciais resíduos fosforiláveis na sequência de aminoácidos de cSrt2 e sua relação com as regiões equivalentes às de localização nuclear em Snail (Domínguez et al., 2003) e hSRT1 e de repressão em hSRT1 (Nakakura et al., 2001a).

4.1.3 Análise filogenética

O genoma de mamíferos apresenta duas isoformas de Scrt: *Scrt1* e *Scrt2* (Marín e Nieto, 2006). Em contraste, a base de dados do NCBI para o genoma de galinha acusava apenas um homólogo, cuja anotação o havia classificado como *Scrt2*. Tendo em vista a identificação da região 5' que está ausente na sequência do NCBI, achamos necessário reavaliar a identidade do nosso clone através de uma nova análise filogenética molecular. Para isso, alinhamos a sequência de aminoácidos da proteína codificada por nosso clone completo com ortólogos Scrt de cordados cuja sequência codificante completa também é conhecida. Na árvore filogenética gerada a partir desse alinhamento, nosso clone é agrupado com ortólogos Scrt2 de mamíferos com valor *bootstrap* máximo de 100%, o que indica alta significância do grupo (Fig. 13). Além disso, essa árvore reproduziu o padrão de evolução dos ortólogos utilizados observado em análises anteriores (Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005). Assim, confirmamos a identidade de nossa sequência como um ortólogo Scrt2.

4.2 Análise do padrão de expressão de *cScrt2* no embrião de galinha

4.2.1 Análise temporal

Os trabalhos realizados em invertebrados mostraram que, nesses animais, *Scrt* participa do processo neurogênese no embrião (Ellis e Horvitz, 1991; Metzstein e Horvitz, 1999; Roark et al., 1995). Se essa função é conservada em vertebrados, os genes *Scrt* devem ser expressos durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o que já foi confirmado para *Scrt1* e *Scrt2* de camundongo (Marín e Nieto, 2006; Nakakura et al., 2001a). No embrião de galinha, o tubo neural, rudimento do sistema nervoso central, se forma em HH 9. Alguns poucos neurônios já se diferenciam logo após o fechamento do tubo neural, mas em HH 17 células em diferenciação já podem ser detectadas ao longo de todo o tubo neural (Fujita, 1964; Thiery et al., 1985). Para verificar a expressão de *cScrt2* durante estes momentos iniciais do desenvolvimento neural, realizamos experimentos de RT-PCR comparando amostras de cDNA total de diferentes períodos do desenvolvimento entre HH 8 e HH 26. Uma primeira análise, semi-quantitativa, mostrou que a expressão aumentava a níveis detectáveis por PCR convencional a partir de HH 18-19 (Fig. 14A). Outras amostras de cDNA

Figura 13 - Árvore filogenética da família *Scrt* em cordados. A proteína codificada por nosso clone completo (em vermelho) é homóloga a *Scrt2*. Os números indicam os valores bootstrap para os respectivos nós. Linha cheia: *Scrt2*; linha tracejada: *Scrt1*. Bf: *Branchiostoma floridae* (anfioxo); Dr: *Danio rerio* (zebrafish); Gg: *Gallus gallus* (galinha); Hs: *Homo sapiens* (humano); Mm: *Mus musculus* (camundongo); Rn: *Rattus norvegicus* (rato).

Figura 14 - Variação temporal da expressão de *cScrt2* durante a embriogênese. Amostras de cDNA total de estágios entre HH 8 e HH 26 foram submetidas a análises semi-quantitativa por PCR convencional (A) e quantitativa por PCR em tempo real (B). Em (B) os valores do gráfico são relativos à expressão basal em HH 8-10. *β-actina* foi utilizada como controle endógeno em ambos os experimentos.

foram submetidas a análise quantitativa por PCR em tempo real. Esse experimento mostrou que, primeiramente, em HH 15-16 a expressão de *cScrt2* tem um pequeno aumento para $3,05 \pm 0,01$ vezes a expressão em HH 8-10, aqui considerada basal. Em seguida, ocorre um aumento drástico desse nível de expressão para $21,54 \pm 4,49$ vezes em HH 18, $65,49 \pm 10,42$ vezes em HH 20 e $118,27 \pm 31,22$ vezes em HH 22. Ao final do período analisado, entre HH 24-26, o nível de expressão não se altera significativamente em relação a HH 22 (Fig. 14B).

4.2.2 Análise espacial

Para verificar se esse aumento de expressão de *cScrt2* era específico de tecidos neurais, realizamos hibridações *in situ* em embriões inteiros e em cortes transversais de embriões entre HH 9 e E6. O controle negativo desses experimentos foi realizado com a sonda senso do fragmento de 204 pb (Fig. 15A), que não produziu sinal detectável (Fig. 15B). A sonda antisense utilizada corresponde ao fragmento de 323 pb de *cScrt2* (Fig. 15A). Consistente com os resultados obtidos no PCR quantitativo, entre HH 8-10 nenhuma expressão foi observada em embriões inteiros (Fig. 15C-E).

Nas hibridações feitas em cortes, analisamos o desenvolvimento da medula espinhal e também dos gânglios da raiz dorsal (GRD) da região truncal de embriões entre HH 15 e E6. Para poder observar a dinâmica de expressão de *cScrt2* durante o início da neurogênese, focamos nossa análise especificamente na altura dos membros anteriores em todos os estágios embrionários analisados, com o objetivo de evitar disparidades causadas pela heterogeneidade ao longo do eixo antero-posterior da medula espinhal, inerente ao seu desenvolvimento (Gilbert, 2006). Até HH 17, nenhuma expressão foi detectada na região truncal (Fig. 16B). Contudo, a expressão de *cScrt2* já está presente na região do rombencéfalo em HH15-16 (Fig. 16A) e em camadas externas do tubo neural cefálico a partir de HH 17 (Fig. 16J). A expressão de *cScrt2* na medula

Figura 15 - Sondas *cScrt2* utilizadas e expressão entre HH 8-10. (A) Sondas utilizadas nos experimentos de hibridação *in situ*. (B) Marcação ausente em corte hibridado com sonda senso, como controle negativo. (C-E) Embriões inteiros HH 8 (C), HH 9 (D) e HH 10 (E) hibridados com sonda antisense.

espinhal trunca foi observada a partir de HH 18-19, em um campo de expressão contínuo em todo o eixo dorso-ventral, excluindo as placas do teto e do assoalho (Fig. 16C). Na região dorsal, a presença de *cScrt2* é limitada a uma estreita faixa nas camadas mais externas do tubo neural. Em contraste, na região ventral o campo de expressão é maior, e engloba os domínios previamente descritos como de precursores de motoneurônios (Fig. 2; Ericson et al., 1992). Nesse estágio não detectamos marcação na região ventricular (Fig. 16C).

Entre HH 20-22, observa-se uma diminuição de expressão de *cScrt2* na camada mais externa dos domínios motores, na região ventral, enquanto o campo de expressão dorsal é ligeiramente expandido em direção à zona ventricular (Fig. 16D-E). Além disso, em HH 22 detectamos pela primeira vez um fraco sinal nos GRDs (Fig. 16E). Em HH 23, a presença de *cScrt2* diminui significativamente na região ventrolateral do domínio dos motoneurônios, enquanto na região dorsal o campo de expressão aumenta em relação aos estágios anteriores e agora se concentra em uma faixa mais espessa em uma região intermediária do eixo próximo-distal do neuroepitélio (Fig. 16F). Além disso, nesse momento a expressão de *cScrt2* nos GRDs pode ser claramente observada (Fig. 16F). Em todos os estágios descritos até aqui, nenhuma expressão é detectada nas placas do assoalho e do teto do tubo neural.

Em E6, a expressão de *cScrt2* na região ventral do tubo neural se restringe a poucos corpos celulares esparsamente distribuídos, enquanto na região dorsal do tubo neural a expressão é intensa em camadas mais internas do neuroepitélio. Agora, *cScrt2* é expresso em algumas células da camada periventricular, inclusive nas placas do assoalho e do teto (Fig. 16G-H). Nos GRDs, é possível observar dois domínios com intensidade de expressão diferenciada, sendo essa maior no domínio dorsomedial (Fig. 16H-I).

Em todos os cortes analisados, transcritos foram observados exclusivamente em tecidos neurais (Fig. 16K).

Figura 16 - Expressão de *cScrt2* entre HH 17 e E6. Hibridação *in situ* mostrando expressão específica no sistema nervoso em cortes transversais do rombencéfalo em HH 15 (A), da medula espinhal truncal em HH 17 (B), HH 19 (C), HH 20 (D), HH 22 (E), HH 23 (F) e E6 (H), da região cefálica em HH 17 (J), e incluindo as regiões truncal e caudal da medula espinhal em HH 23 (K). (G) e (I) são aumentos das áreas delimitadas em (H). co: cálice óptico; di: diencefalo; grd: gânglio da raiz dorsal; no: notocorda; tn: tubo neural. A: anterior; P: posterior.

4.3 Expressão de *cScrt2* em relação a outros fatores envolvidos na neurogênese

No tubo neural, os neurônios são gerados por progenitores proliferantes que se encontram na zona ventricular, ao redor do lúmen. As células progenitoras que saem do ciclo celular migram em direção à zona do manto e iniciam a diferenciação neural durante esse trajeto. A saída do ciclo celular é considerada o momento de nascimento do neurônio. No tubo neural, portanto, a zona ventricular é composta por células-tronco mitoticamente ativas, enquanto a zona do manto é composta por neurônios diferenciados (Hollyday, 2001).

Com o objetivo de posicionar o campo de expressão de *Scrt2* dentro do processo de neurogênese na medula espinhal do embrião de galinha, realizamos experimentos de hibridação *in situ* onde comparamos seu padrão de expressão com o de *Notch1*, que é expresso em células-tronco neurais (Henrique et al., 1995), e *SCG10*, marcador de neurônios diferenciados (Stein et al., 1988). Novamente, para evitar disparidades geradas por diferenças de expressão ao longo do eixo antero-posterior, nossas análises foram realizadas em cortes transversais sequenciais da região trunca de embriões nos estágios HH 21 e HH 23.

Em ambos os estágios analisados, não observamos sobreposição entre os campos de expressão de *Notch1* e *Scrt2*. Enquanto *Notch1* é expresso sempre apenas na zona ventricular do tubo neural (Fig. 17A,D; Henrique et al., 1995), o campo de expressão de *Scrt2* não coincide com o de *Notch1* e está localizado externamente a este em relação ao lúmen do tubo neural (Fig. 17B,E). Aparentemente, existe uma distância entre eles, sugerindo que a população de células *Notch1*-positivas é completamente distinta da população de células que expressam *Scrt2*.

Em HH 21, *SCG10* é expresso apenas nas células ventrolaterais do domínio dos motoneurônios (Fig. 17C). Em HH 23, seu campo de expressão nessa região expande significativamente em direção à zona ventricular, e a expressão é detectada também em uma estreita faixa externa do tubo neural dorsal (Fig. 17F). Para nos certificarmos de que o domínio ventrolateral é de fato constituído por precursores de motoneurônios, realizamos imunohistoquímicas para o fator de transcrição *Islet1*, um marcador de motoneurônios em início de diferenciação (Cui e Goldstein, 2000; Ericson et al., 1992), em cortes transversais da

região trunca de outro embrião HH 23. De fato, o padrão de expressão de *Islet1* é semelhante ao de *SCG10* na região ventral (Fig. 17G).

Os campos de expressão de *SCG10* e *Scrt2* são aparentemente complementares em ambos os estágios (Fig. 17B-C,E-F). Enquanto em HH 23 *SCG10* está presente nas células mais externas do tubo neural dorsal, em nenhum momento encontramos células positivas para *Scrt2* nesta localização (Fig. 17E-F). Da mesma forma, na região dos motoneurônios, as células que expressam *Scrt2* estão localizadas em uma região mais interna e dorsal em relação às células que expressam *SCG10* (Fig. 17B-C,E-F). Contudo, os campos de expressão de *Scrt2* e *SCG10* parecem ser bastante próximos, ao contrário do que acontece entre *Scrt2* e *Notch1*. Esses campos de expressão parecem complementares, porém, por serem observados em cortes sequenciais, não podemos excluir a possibilidade de que em suas fronteiras existam células que expressem ambos os genes.

Figura 17 - Comparação da expressão de *cScrt2* com outros fatores expressos durante a neurogênese. (A-F) Experimentos de hibridação *in situ* em cortes transversais mostrando a expressão de *Notch1* (A,D), *Scrt2* (B,E) e *SCG10* (C,F) na medula espinhal trunca do embrião de galinha em estágios HH 21 (A-C) e HH 23 (D-F). (G) Imunohistoquímica para *Islet1* em corte transversal trunca de embrião de galinha HH 23, mostrando expressão nos motoneurônios.

5 DISCUSSÃO

5.1 Evolução da família Scrt em amniotos

No genoma de mamíferos foram identificados dois membros da família: *Scrt1* e *Scrt2* (Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005; Manzanares et al., 2001). Apesar da dúvida gerada pelo processo de anotação do NCBI, nossa clonagem e análise filogenética confirmaram a existência de um homólogo de *Scrt2* em galinha (Figs. 10 e 13). Além de indicar alta significância do grupo *Scrt2*, a árvore filogenética gerada por nossa análise reproduziu o padrão de evolução observado em análises anteriores (Fig. 13; Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005). Até o momento, a única outra sequência homóloga a *Scrt* de aves presente nas bases de dados do NCBI pertence ao pássaro mandarim (*Taeniopygia guttata*; acesso XM_002193257) e ainda não foi classificada pelo processo de anotação. No entanto, a comparação da tradução prevista dessa sequência com outros homólogos de *Scrt* em alinhamentos gerados pelo programa BLAST indica que esse gene compartilha maior identidade com ortólogos *Scrt2* do que com ortólogos *Scrt1*. As sequências de aminoácidos de c*Scrt2* e da proteína hipotética do mandarim compartilham identidade de 95% nos últimos 265 resíduos. A existência de um homólogo de *Scrt1* em aves permanece dúbia e sua confirmação depende da conclusão do sequenciamento dos genomas da galinha e do mandarim.

5.2 Domínios de c*Scrt2*

A tradução prevista do nosso clone produz uma proteína de 276 aminoácidos onde todos os domínios esperados para uma proteína Scratch podem ser delimitados: SNAG, Scratch e cinco *zinc-fingers* (Fig. 10). Enquanto a função dos domínios *zinc-fingers* é se ligar a sequências E-box do DNA (Kataoka et al., 2000; Mauhin et al., 1993; Nakakura et al., 2001a), a função dos outros domínios de *Scrt* ainda é desconhecida. Em membros da família Snail, o domínio SNAG é importante para a função de repressão (Batlle et al., 2000; Hemavathy et al., 2000; Kataoka et al., 2000), mas ensaios de repressão de transcrição realizados com h*SCRT1* sugerem que essa função de SNAG não foi conservada dentro da superfamília. Em h*SCRT1*, o domínio importante para essa função parece estar concentrado na região

compreendida entre os 40 primeiros aminoácidos e os *zinc-fingers* e, portanto, exclui o domínio SNAG (Nakakura et al., 2001a). Essa região corresponde aos resíduos 44-128 de cScrt2, onde se encontra o domínio Scratch (Fig. 12). É possível, portanto, que nas proteínas Scrt o domínio homônimo seja importante para a função de repressão.

A região compreendida entre os resíduos 44-128 também inclui um potencial sítio de fosforilação por diferentes quinases, formado pelos resíduos tirosina₇₇, serina₇₈ e serina₈₂ (Fig. 12). Nas proteínas Snail, a porção N-terminal contém uma região rica em serina cuja fosforilação aumenta a translocação para o citoplasma e diminui a atividade de repressão de transcrição (Domínguez et al., 2003), e que corresponde aos resíduos 10-85 de cScrt2, onde também estão incluídos os resíduos supracitados. Essa correspondência, juntamente com a potencialidade de fosforilação por diferentes quinases, torna estes resíduos fortes candidatos a sítios de regulação da localização de cScrt2. Considerando a presença desses resíduos fosforiláveis na região equivalente à de atividade repressora em hSCRT1, é possível que uma das formas de controlar a ação nuclear dos fatores Scrt seja a regulação de sua localização celular pelo nível de fosforilação. Apesar disso, Nakakura et al. observaram que, em hSCRT1, o domínio de localização nuclear se encontra na região dos *zinc-fingers* (Nakakura et al., 2001a). De qualquer maneira, nossa análise também identificou possíveis resíduos fosforiláveis na região dos *zinc-fingers*: serina₁₂₉, treonina₁₃₉, treonina₁₄₉ e tirosina₁₆₈ (Fig. 12). É possível, portanto, que em cScrt2 a fosforilação desses domínios também seja utilizada para regular a localização celular.

5.3 Conservação da expressão de *Scrt* durante a embriogênese de vertebrados

Em todos os estágios de desenvolvimento analisados, nossos dados indicam que cScrt2 é expresso exclusivamente no sistema nervoso (Fig. 16), porém não identificamos especificamente os tipos celulares. Em camundongos, a expressão de *Scrt2* no sistema nervoso foi verificada também nas células de Schwann do nervo vomeronasal e em populações gliais do telencéfalo (Marín e Nieto, 2006). Nossos resultados não excluem a possibilidade de que, na medula espinhal, cScrt2 seja expresso tanto por células da glia quanto por neurônios. A comparação da expressão de cScrt2 com GFAP, marcador glial, é necessária para confirmar essa questão.

Assim como *cScrt2*, na medula espinhal do embrião de camundongo também é observada expressão de *mScrt1* e *mScrt2*, e a zona ventricular também é excluída do campo de expressão dos genes *mScrt* (Marín e Nieto, 2006). No entanto, enquanto o campo de expressão de *mScrt2* apresenta uma descontinuidade dentro de eixo dorso-ventral, correspondente à região dos interneurônios V2 que expressam Chx10, os campos de expressão de *mScrt1* e *cScrt2* não apresentam tal característica (compare Figs. 5 e 16C-F). Portanto, apesar da sequência de *cScrt2* compartilhar maior identidade com *mScrt2*, seu padrão de expressão na medula espinhal embrionária é mais semelhante ao de *mScrt1*. Uma situação similar envolve dois outros membros da superfamília Snail: *Snail1* e *Snail2*. No camundongo, *Snail1* é expresso em células da crista neural pré-migratória e *Snail2* na crista neural migratória. Em contraste, na galinha *Snail1* é expresso nas células migratórias, enquanto *Snail2* é expresso na crista neural pré-migratória (Sefton et al., 1998). No anfíbio *Xenopus laevis*, o padrão de expressão de *Snail1* e *Snail2* é semelhante ao de camundongo (Essex et al., 1993; Mayor et al., 1995). Sefton et al. propõem que, durante a evolução das aves, os sítios de expressão de *Snail1* e *Snail2* teriam sido invertidos pela recombinação de sequências regulatórias de seus promotores (Sefton et al., 1998). A redundância de função e a pressão seletiva resultante da importância dos genes Snail durante o desenvolvimento embrionário teriam possibilitado a troca de funções entre os genes, mas não a desativação de ambos em uma mesma população. Da mesma forma, é possível que recombinações de regiões regulatórias ocorridas após a duplicação do gene ancestral de *Scrt1* e *Scrt2* tenham gerado funções particulares de cada gene não necessariamente conservadas em todos os grupos de vertebrados. Porém, como mencionado anteriormente, a existência de *Scrt1* em aves ainda não foi comprovada.

Assim como *mScrt1* e *mScrt2* são expressos na região cefálica (Marín e Nieto, 2006), observamos também a expressão de *cScrt2* em algumas regiões do encéfalo embrionário, como nas camadas mais externas do diencéfalo em HH 17 (Fig. 16J). Outra característica conservada dos genes *Scrt* em vertebrados é sua presença em derivados da crista neural do sistema nervoso periférico: assim como *mScrt1* e *mScrt2*, *cScrt2* também é expresso nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) durante o desenvolvimento embrionário (Fig. 16F,H-I; Marín e Nieto, 2006; Nakakura et al., 2001a).

5.4 Função de *Scrt* dentro do processo de neurogênese

No início do desenvolvimento do tubo neural posterior, a expressão de *cScrt2* nunca é detectada na zona ventricular e em células que expressam *Notch1*, o que sugere que *cScrt2* é expresso apenas em células pós-mitóticas (Figs 16C-F e 17A-B,D-E). De fato, dados anteriores indicaram que as células que expressam *mScrt1* no embrião de camundongo não incorporam BrdU (Nakakura et al., 2001a). A expressão de *cScrt2* em algumas células da zona ventricular ventral em E6 é provavelmente um reflexo dos últimos eventos de nascimento neural, e não da expressão em células mitoticamente ativas (Fig. 16G-H).

cScrt2 também não é expresso em neurônios diferenciados que expressam *SCG10* (Fig. 17B-C,E-F), sugerindo uma possível função específica dos momentos iniciais de diferenciação. No período analisado neste trabalho, essa característica é mais evidente na região ventral, onde estão os motoneurônios. Na medula espinhal, a região ventral é formada por motoneurônios, enquanto a região dorsal é formada por neurônios sensoriais (Hollyday, 2001). Durante a embriogênese da medula espinhal, neurônios diferenciados são observados primeiramente na metade ventral do tubo neural, ou seja, no domínio motor. A neurogênese dos motoneurônios da medula espinhal no embrião de galinha se inicia em HH 17 e é intensa até E5 (Ericson et al., 1992; Hollyday e Hamburger, 1977). A neurogênese dos neurônios sensoriais é mais tardia, e a geração de alguns neurônios ainda é observada em E8-E9 (Fujita, 1964). O período que analisamos (HH 15 a E6) inclui todo o período de neurogênese no domínio motor. Dentro deste domínio, a neurogênese se inicia na região central e em seguida novos neurônios são formados e adicionados nas laterais (Hollyday e Hamburger, 1977). O início da diferenciação de motoneurônios é marcado pela expressão de *Islet1* (Ericson et al., 1992), enquanto *SCG10* é expresso em estágios terminais da diferenciação neural (Stein et al., 1988). Interessantemente, observamos uma relação entre a dinâmica de expressão de *cScrt2* no domínio motor e a dinâmica de neurogênese relatada para este local. Em HH 19, a expressão de *cScrt2* compreende toda a região ventral do tubo neural (Fig. 16C). Entre HH 20-22, a expressão de *cScrt2* diminui progressivamente na região central do domínio motor (Fig. 16D-E). Em HH 23, a expressão na região ventral se restringe a uma estreita faixa na fronteira mais interna do domínio motor com a zona ventricular (Fig. 16F), e é excluída das células que expressam *Islet1* e *SCG10* (Fig. 17B-C,E-G). Em E6, apenas algumas células da região ventral esparsamente distribuídas expressam *cScrt2* (Fig. 16G-H).

Estes dados sugerem que *cScrt2* é expresso apenas em momentos iniciais do processo de neurogênese de motoneurônios. De fato, a expressão de *Islet1*, que marca o início da diferenciação em motoneurônios, começa na região mais ventrolateral do domínio motor e expande em direção ao centro em estágios posteriores (Ericson et al., 1992). Em contrapartida, a expressão de *cScrt2* diminui primeiro na região ventrolateral do domínio motor e é progressivamente restrita à região mais interna deste subdomínio, onde *Islet1* não é expresso. Em outras palavras, a expressão de *cScrt2* precede a expressão de *Islet1*, primeiro na região ventrolateral e em seguida na região central do domínio motor.

Interessantemente, um papel específico de *Scrt2* em células pós-mitóticas em início de diferenciação parece estar presente também em algumas populações de células do sistema nervoso de camundongo. Por exemplo, em estágios pós-natais *mScrt2* é expresso na interface entre as zonas ventricular e do manto da camada granular externa do cerebelo (Marín e Nieto, 2006), onde estão células pós-mitóticas em início de migração (Miyata et al., 1999). Esse padrão de expressão de *mScrt2* pode ser comparado ao padrão de expressão de *cScrt2* na medula espinhal em HH 23.

No domínio sensorial da medula espinhal, o campo de expressão de *cScrt2* se restringe a uma estreita faixa externa entre HH 17-22 (Fig. 16C-E). Em HH 23, a expressão se expande em direção à zona ventricular (Fig. 16F). Em E6, *cScrt2* passa a ser intensamente expresso no domínio sensorial, e a expressão nas camadas mais externas diminui (Fig. 16G-H). A neurogênese sensorial ocorre em estágios posteriores à neurogênese motora (Fujita, 1964; Hollyday e Hamburger, 1977). Se a dinâmica de expressão de *cScrt2* na neurogênese sensorial é semelhante ao que acontece no domínio motor, ou seja, sempre restrita à população de células em início de diferenciação, é possível que a intensa expressão no domínio dorsal em E6 seja reflexo da neurogênese de uma população sensorial nesse estágio do desenvolvimento. Se esse for o caso, assim como a expressão de *cScrt2* não é mais detectada no domínio motor em E6, é possível que o mesmo aconteça no domínio sensorial após E9, quando cessa a neurogênese sensorial da medula espinhal (Fujita et al., 1964). A análise da expressão de *cScrt2* e de marcadores de início de diferenciação de neurônios sensoriais em estágios mais tardios do desenvolvimento da medula espinhal é necessária para responder essa questão.

Durante o desenvolvimento dos GRDs, os eventos de diferenciação de subtipos neuronais também são segregados espacialmente e temporalmente. Em um primeiro momento, são formados os neurônios mecanoceptivos e proprioceptivos do domínio ventrolateral do GRD. Em seguida, são formados os neurônios nociceptivos do domínio dorsomedial (Lawson e Biscoe, 1979; Ma et al., 1999). Em HH 23, não é possível afirmar se a expressão de *cScrt2* no GRD é mais intensa em algum dos dois domínios, mas em E6 é evidente que a expressão é mais intensa no domínio dorsomedial (Fig. 16F,H-I). Da mesma forma que no tubo neural, é possível que *cScrt2* atue nos momentos iniciais da diferenciação das diferentes populações neurais dos GRDs. Se isso é verdade, é possível que a expressão observada em HH 23 esteja concentrada no domínio ventrolateral, onde os primeiros neurônios dos GRDs se diferenciam. Outra possibilidade é que a função de *cScrt2* seja restrita a subtipos celulares do GRD, e que a expressão diferenciada entre os domínios dorsomedial e ventrolateral em E6 seja um reflexo disso.

5.5 Scrt e a cascata molecular do programa neural

A presença de Scrt apenas em células pós-mitóticas e indiferenciadas sugere uma função dentro de um breve momento dentro do processo de neurogênese. Como mencionado, *cScrt2* nunca é expresso em células-tronco, que expressam *Notch1* (Fig. 17A-B,D-E). O campo de expressão de *cScrt2* também é diferente do campo de expressão de *Sox3*, outro fator expresso pelas células-tronco neurais (Fig. 3). Enquanto *Notch1* deixa de ser expresso no momento de nascimento do neurônio, *Sox3* é desativado em um momento posterior, quando fatores pró-neurais são ativados e reprimem a expressão dos genes *SoxB1* (Bylund et al., 2003). A comparação de nossos resultados (Fig. 16F) com dados previamente publicados acerca da expressão de *Sox3* (Fig. 3) na medula espinhal em estágio HH 23 sugere uma complementaridade entre os campos de expressão de *Sox3* e *Scrt2* nessa região, mas é possível que algumas células expressem ambos os genes ao mesmo tempo. A comparação exata de seus campos de expressão é necessária para responder essa questão. Se houver sobreposição, é possível que uma das funções de *Scrt2* seja a de reprimir a expressão de fatores que mantêm o estado indiferenciado, como *Sox1-3*.

Os fatores de transcrição do tipo bHLH são considerados elementos chave dentro do processo de neurogênese (Bertrand et al., 2002). Durante o desenvolvimento do córtex

cerebral, enquanto os fatores bHLH da família Hes participam da manutenção do estado proliferativo das células-tronco neurais, fatores bHLH pró-neurais, como Ash1, Ngn1 e Ngn2, são ativados coordenadamente nos estágios iniciais de diferenciação neural, e NeuroD, outro fator bHLH, é ativado em estágios mais avançados da diferenciação neural (Ross et al., 2003). Interessantemente, os fatores bHLH e os membros da superfamília Snail se ligam à mesma sequência E-box do DNA (Johnson et al., 1992; Mauhin et al., 1993; Nakakura et al., 2001a). Além disso, a interação entre fatores bHLH e Snail já foi demonstrada. Por exemplo, Smuc, um membro da família Snail, inibiu a ligação do fator bHLH MyoD à sequência E-box de maneira dose-dependente, suprimindo sua atividade sobre a transcrição (Kataoka et al., 2000). Em ensaios semelhantes, Nakakura et al. demonstraram que hSCRT1 também é capaz de inibir a transativação de um gene repórter por hASH1 (Nakakura et al., 2001a). Em ambos os trabalhos, foi proposto que os fatores de transcrição do tipo *zinc-finger* poderiam modular a atividade dos fatores bHLH através da competição pelas sequências E-box. Em linhagens celulares humanas, foi verificado que hASH1 e hSCRT1 são expressos logo após a indução da diferenciação neural por ácido retinóico, enquanto hASH1 começa a ser expresso antes de hSCRT1 (Nakakura et al., 2001a). A modulação da transativação de promotores com sítios E-box parece um importante mecanismo da ação de Scrt dentro do programa neural.

Alguns fatores bHLH pró-neurais, como Ash1 e NeuroM, são rapidamente ativados e desativados em estágios iniciais da neurogênese (Lo et al., 1991; Roztocil et al., 1997), de forma semelhante ao que parece ser o caso de cScrt2. A expressão transiente desses genes pode ser um reflexo da necessidade desses fatores especificamente em momentos de transição entre os estados celulares de proliferação e diferenciação. Uma possibilidade é que os efeitos de fatores como Scrt2, Ash1 e NeuroM sobre a transcrição e a modulação da atividade de outros fatores que se ligam aos sítios E-box sejam importantes mecanismos moleculares para a indução do comprometimento com o destino de diferenciação neural. Particularmente, é notável a semelhança do padrão de expressão de *cScrt2* e de *NeuroM* durante a embriogênese inicial da medula espinhal em galinha. Em HH 23, ambos são expressos em uma faixa intermediária entre as zonas ventricular e do manto (compare Figs. 3 e 16F), ou seja, não são expressos pela maioria das células proliferantes e pela maioria das células diferenciadas. Pouco se sabe sobre a função de NeuroM dentro do processo de neurogênese, mas seu homólogo em *Xenopus*, ATH3, é capaz de promover a diferenciação

neural (Takebayashi, 1997). É possível, portanto, que *NeuroM* e *cScrt2* atuem juntos para induzir o início da diferenciação neural. O sinergismo entre fatores *Scrt* e bHLH para promover a neurogênese já foi verificado em *Drosophila*, onde mutantes duplos *scrt; dpn* apresentam graves defeitos do sistema nervoso e mutantes simples *scrt* ou *dpn* apresentam um fenótipo razoavelmente brando (Roark et al., 1995). No entanto, *scrt* e *dpn* continuam sendo expressos em estágios tardios de diferenciação neural, diferentemente de *cScrt2* e *NeuroM*. É possível que a janela de ação dos fatores de *Scrt* na neurogênese seja uma característica diferenciada entre vertebrados e invertebrados, porém dentro uma função mais ampla conservada de promoção da neurogênese.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

- 1) O gene clonado corresponde ao homólogo de *Scrt2* em galinha (*cScrt2*).
- 2) Todos os domínios dos fatores *Scrt* de vertebrados são conservados em *cScrt2*.
- 3) O início da expressão de *cScrt2* durante a embriogênese coincide com o início da neurogênese.
- 4) A expressão de *cScrt2* durante a embriogênese inicial é exclusiva do sistema nervoso; a especificidade de expressão dos genes *Scrt* no sistema nervoso foi conservada entre aves e mamíferos.
- 5) Tanto células do sistema nervoso central quanto células do sistema nervoso periférico expressam *cScrt2*; a presença dos genes *Scrt* em ambas as divisões do sistema nervoso foi conservada entre aves e mamíferos.
- 6) *cScrt2* é expresso na medula espinhal e no encéfalo embrionários; a presença dos genes *Scrt* ao longo de todo o eixo antero-posterior foi conservada entre aves e mamíferos.
- 7) Na medula espinhal, *cScrt2* não é expresso em células-tronco neurais, que expressam *Notch1*, nem em neurônios diferenciados, que expressam *SCG10*.

REFERÊNCIAS*

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005 Jul;132(14):3151-61. Revisão.

Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):84-9.

Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jul;3(7):517-30. Revisão.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 2003 Nov;6(11):1162-8.

Chenn A, McConnell SK. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell.* 1995 Aug 25;82(4):631-41.

Cornell RA, Eisen JS. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Dec;16(6):663-72. Revisão.

Cui S, Goldstein RS. Early markers of neuronal differentiation in DRG: islet-1 expression precedes that of Hu. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000 Jun 30;121(2):209-12.

Del Barrio MG, Nieto MA. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development.* 2002 Apr;129(7):1583-93.

Del Barrio MG, Nieto MA. Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo. *Dev Dyn.* 2004 Jan;229(1):136-9.

* De acordo com o sistema Vancouver para a citação de referências bibliográficas.

Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Francí C, García de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. 2003 Jul;23(14):5078-89.

Easter SS Jr, Ross LS, Frankfurter A. Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci*. 1993 Jan;13(1):285-99.

Ellis RE, Horvitz HR. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development*. 1991 Jun;112(2):591-603.

Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science*. 1992 Jun 12;256(5063):1555-60.

Essex LJ, Mayor R, Sargent MG. Expression of *Xenopus* snail in mesoderm and prospective neural fold ectoderm. *Dev Dyn*. 1993 Oct;198(2):108-22.

Fujita S. Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J Comp Neurol*. 1964 Jun;122:311-27.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 8 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer; 2006. 817 p.

Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*. 1996 Nov;16(11):6263-72.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph*. 1951;88:49-92.

Hämmerle B, Tejedor FJ. A novel function of DELTA-NOTCH signalling mediates the transition from proliferation to neurogenesis in neural progenitor cells. *PLoS One*. 2007 Nov 14;2(11):e1169.

Hemavathy K, Guru SC, Harris J, Chen JD, Ip YT. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(14):5087-95.

Henrique D, Adam J, Myat A, Chitnis A, Lewis J, Ish-Horowicz D. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):787-90.

Hollyday M, Hamburger V. An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the chick embryo. *Brain Res.* 1977 Aug 26;132(2):197-208. Revisão.

Hollyday M. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci.* 2001 Apr;19(2):161-73.

Jacobson M. *Developmental Neurobiology*. 3 ed. New York, New York: Plenum Press; 1991. 776 p.

Johnson JE, Birren SJ, Saito T, Anderson DJ. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 15;89(8):3596-600.

Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, Ozaki H, Yokota Y, Nishikawa S, Kita T. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):626-33.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.

Lawson SN, Biscoe TJ. Development of mouse dorsal root ganglia: an autoradiographic and quantitative study. *J Neurocytol.* 1979 Jun;8(3):265-74.

Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science.* 1995 May 12;268(5212):836-44.

Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1990;17(2):118-32.

Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ. Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1524-37.

Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* 1999 Jul 1;13(13):1717-28.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.

Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. Trends Genet. 2001 Apr;17(4):178-81.

Marín F, Nieto MA. The expression of Scratch genes in the developing and adult brain. Dev Dyn. 2006 Sep;235(9):2586-91.

Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. Nucleic Acids Res. 1993 Aug 25;21(17):3951-7.

Mayor R, Morgan R, Sargent MG. Induction of the prospective neural crest of Xenopus. Development. 1995 Mar;121(3):767-77.

McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. Int J Dev Biol. 1993 Mar;37(1):135-40. Revisão.

Menezes JR, Luskin MB. Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. J Neurosci. 1994 Sep;14(9):5399-416.

Metzstein MM, Horvitz HR. The C. elegans cell death specification gene ces-1 encodes a snail family zinc finger protein. Mol Cell. 1999 Sep;4(3):309-19.

Miyata T, Maeda T, Lee JE. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. Genes Dev. 1999 Jul 1;13(13):1647-52.

Mori N, Morii H. SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging. J Neurosci Res. 2002 Nov 1;70(3):264-73. Revisão.

Myat A, Henrique D, Ish-Horowicz D, Lewis J. A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. Dev Biol. 1996 Mar 15;174(2):233-47.

Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE, Sriuranpong V, Borges MW, Nelkin BD, Ball DW. Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001a Mar 27;98(7):4010-5.

Nakakura EK, Watkins DN, Sriuranpong V, Borges MW, Nelkin BD, Ball DW. Mammalian Scratch participates in neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001b Nov 1;95(1-2):162-6.

Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science*. 1994 May 6;264(5160):835-9.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):155-66. Revisão.

Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*. 1996 Aug;12(4):357-8.

Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R. A role for SOX1 in neural determination. *Development*. 1998 May;125(10):1967-78.

Roark M, Sturtevant MA, Emery J, Vaessin H, Grell E, Bier E. scratch, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev*. 1995 Oct 1;9(19):2384-98.

Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*. 2003 Jul 3;39(1):13-25. Revisão.

Roztocil T, Matter-Sadzinski L, Alliod C, Ballivet M, Matter JM. NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development*. 1997 Sep;124(17):3263-72.

Sanes DH, Reh TA, Harris WA. *Development of the Nervous System*. 2 ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press; 2006. 373 p.

Sechrist J, Bronner-Fraser M. Birth and differentiation of reticular neurons in the chick hindbrain: ontogeny of the first neuronal population. *Neuron*. 1991 Dec;7(6):947-63.

Sefton M, Sánchez S, Nieto MA. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*. 1998 Aug;125(16):3111-21.

Stein R, Mori N, Matthews K, Lo LC, Anderson DJ. The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. *Neuron*. 1988 Aug;1(6):463-76.

Swartz M, Eberhart J, Mastick GS, Krull CE. Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Dev Biol*. 2001 May 1;233(1):13-21. Revisão.

Takebayashi K, Takahashi S, Yokota C, Tsuda H, Nakanishi S, Asashima M, Kageyama R. Conversion of ectoderm into a neural fate by ATH-3, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene atonal. *EMBO J*. 1997 Jan 15;16(2):384-95.

Thiery JP, Delouvé A, Grumet M, Edelman GM. Initial appearance and regional distribution of the neuron-glia cell adhesion molecule in the chick embryo. *J Cell Biol*. 1985 Feb;100(2):442-56.

Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT. Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev*. 1995 Jan;49(1-2):23-36.

Wolpert L, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E, Smith J. *Princípios de Biologia do Desenvolvimento*. 3 ed. Porto Alegre, RS: Artmed; 2008. 576 p.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2006 Jan 4;26(1):3-11.

ANEXOS

ANEXO A – Sequenciamento de cScrt2(434pb)

- Primers de clonagem: Fw1/Rv1 (Fig. A1)
- Construção: pGEM-T(cScrt2-434pb)
- Primer de sequenciamento: T7 (Fig. A2)

Figura A1 - Clonagem de *cScrt2(434pb)*. O fragmento de 434 pb foi clonado com os primers Fw1e Rv1, desenhados sobre a sequência do acesso NCBI XM_426994.

Figura A2 - Sequência de *cScrt2(434pb)*. Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pGEM-T(*cScrt2-434pb*) com o primer T7.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 771 bits (417) Expect = 0.0

Identities = 432/438 (98%) Gaps = 5/438 (1%)

cSrt2(434pb)

NCBI XM_426994 (707pb)

```
cSrt2(434pb)      1  ACTCCATGGACGCCTTCTTCATCACCGACGGGAGGTGCGTCGACGCGGGAGAGCCAAC   60
|||||
NCBI XM_426994 181  ACTCCATGGACGCCTTCTTCATCACCGACGGGAGGTGCGTCGACGCGGGAGAGCCAAC   240

cSrt2(434pb)      61  GCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGTGCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCCA 120
|||||
NCBI XM_426994 241  GCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGTGCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCCA 300

cSrt2(434pb)     121  ACCTCAGCCGGCACAAGCAGACCCACCGCAGCCTGGACAGCAAGATGGCCAGGAAGTGCC 180
|||||
NCBI XM_426994 301  ACCTCAGCCGGCACAAGCAGACCCACCGCAGCCTGGACAGCAAGATGGCCAGGAAGTGCC 360

cSrt2(434pb)     181  CGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCCCGCCCTGGCCATGCACGTCTCACCCACA 240
|||||
NCBI XM_426994 361  CGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCCCGCCCTGGCCATGCACGTCTCACCCACA 420

cSrt2(434pb)     241  ACCTCAAGCACAAGTGCGACGTCTGCGGCAAAGCCTTCAGCCGGCCCTGGCTGCTGCAGG 300
|||||
NCBI XM_426994 421  ACCTCAAGCACAAGTGCGACGTCTGCGGCAAAGCCTTCAGCCGGCCCTGGCTGCTGCAGG 480

cSrt2(434pb)     301  GCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGCTGCTCTCACTGCAGGGAAGGCC 360
|||||
NCBI XM_426994 481  GCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGCTGCTCTCACTGC-GGGAAGGCC 539

cSrt2(434pb)     361  TTCGCCGACCGCTCCAACCTGCAGCGCCCACATGCAGACCCACTCACGC-TCCAAGCACT 419
|||||
NCBI XM_426994 540  TTCGCCGACCGCTCCAACCTGC-GCGCCCACATGCAGACCCACTC-CGCCTTCAAGCACT 597

cSrt2(434pb)     420  ACAAGTGCAAAGCAGTGC   437
|||||
NCBI XM_426994 598  ACAAGTGCAA-GCAGTGC   614
```

ANEXO B – Sequenciamento de cSrt2(204pb)

- Primers de clonagem: Fw5/Rv5 (Fig. B1)
- Construção: pGEM-T(cSrt2-204pb)
- Primer de sequenciamento: T7 (Fig. B2)

Figura B1 - Clonagem de *cSrt2(204pb)*. O fragmento de 204 pb foi clonado com os primers Fw5 e Rv5, desenhados sobre a sequência do acesso NCBI XM_426994 e de *cSrt2(434pb)*, respectivamente.

Figura B2 - Sequência de *cSrt2(204pb)*. Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pGEM-T(*cSrt2*-204pb) com o primer T7.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 351 bits (190) Expect = 2e-101

Identities = 203/208 (97%) Gaps = 5/208 (2%)

cSrt2(204pb)

NCBI XM_426994 (707pb)

```
cSrt2(204pb)      1  GGAGGAGTACAGCGATCCCGAGAGCCCCCAGTCCACCTTACTCCGCACCGCTACTTCAAC   60
   |||||||
NCBI XM_426994   98  GGAGGAGTACAGCGATCCCGAGAGCCCCCAGTCCACCTT-CTCCGC-CCGCTACTTCAAC   155

cSrt2(204pb)     61  GGGGAGGCGG-GGTGACGGACAGCTACTCCATGGACGCCATTCTTCATCACCGACGGGAG   119
   |||||||
NCBI XM_426994  156  GGGGAGGCGGCGGTGACGGACAGCTACTCCATGGACGCC-TTCTTCATCACCGACGGGAG   214

cSrt2(204pb)    120  GTCGCAGTCGACGCGGGGAGAGCCAACGCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGT   179
   |||||
NCBI XM_426994  215  GTCGC-GTCGACGCGGGGAGAGCCAACGCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGT   273

cSrt2(204pb)    180  GCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCCAA   207
   |||||||
NCBI XM_426994  274  GCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCCAA   301
```

ANEXO C – Sequenciamento de cSrt2(369pb)

- Primers de clonagem: Fw7/Rv8 (Fig. C1)
- Construção: pGEM-T(cSrt2-369pb)
- Primer de sequenciamento: T7 (Fig. C2)

Figura C1 - Clonagem de *cSrt2(369pb)*. O fragmento de 369 pb foi clonado com os primers Fw7 e Rv8, desenhados sobre a sequência de *cSrt2(434pb)* e do acesso NCBI XM_426994, respectivamente.

Figura C2 - Sequência de *cSrt2(369pb)*. Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pGEM-T(cSrt2-369pb) com o primer T7.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 682 bits (369)

Expect = 0.0

cSert2(369pb)

Identities = 369/369 (100%)

Gaps = 0/369 (0%)

NCBI XM_426994 (707pb)

```
cSert2(369pb)      1 AGCAAGATGGCCAGGAAGTGCCCGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCC GCCCTG  60
|||||
NCBI XM_426994  339 AGCAAGATGGCCAGGAAGTGCCCGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCC GCCCTG  398

cSert2(369pb)      61 GCCATGCACGTCCTCACCACAACCTCAAGCACAAGTGCGACGTCTGCGGCAAAGCCTTC 120
|||||
NCBI XM_426994  399 GCCATGCACGTCCTCACCACAACCTCAAGCACAAGTGCGACGTCTGCGGCAAAGCCTTC 458

cSert2(369pb)     121 AGCCGGCCCTGGCTGCTGCAGGGCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGC 180
|||||
NCBI XM_426994  459 AGCCGGCCCTGGCTGCTGCAGGGCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGC 518

cSert2(369pb)     181 TGCTCTCACTGCGGGAAGGCCTTCGCCGACCCTCCAACCTGCGCGCCACATGCAGACC 240
|||||
NCBI XM_426994  519 TGCTCTCACTGCGGGAAGGCCTTCGCCGACCCTCCAACCTGCGCGCCACATGCAGACC 578

cSert2(369pb)     241 CACTCCGCCTTCAAGCACTACAAGTGCAAGCAGTGCGAGAAGACCTTCGCCCTCAAGTCG 300
|||||
NCBI XM_426994  579 CACTCCGCCTTCAAGCACTACAAGTGCAAGCAGTGCGAGAAGACCTTCGCCCTCAAGTCG 638

cSert2(369pb)     301 TACCTCAACAAGCACTACGAGTCCGCCTGCTTCAAGGGCTCCGAACACAGCTGTGCAATA 360
|||||
NCBI XM_426994  639 TACCTCAACAAGCACTACGAGTCCGCCTGCTTCAAGGGCTCCGAACACAGCTGTGCAATA 698

cSert2(369pb)     361 GGGAAGTAG 369
|||||
NCBI XM_426994  699 GGGAAGTAG 707
```

ANEXO D – Sequenciamento de cScrt2(320pb)

- Primers de clonagem: Fw4/Rv6 (Fig. D1)
- Construção: pGEM-T(cScrt2-320pb)
- Primer de sequenciamento: T7 (Fig. D2)

Figura D1 - Clonagem de *cScrt2(320pb)*. O fragmento de 320 pb foi clonado com os primers Fw4 e Rv6, desenhados sobre a sequência consenso da extremidade 5' de *Scrt* em vertebrados (Fig. 7) e de *cScrt2(204pb)*, respectivamente.

Figura D2 - Sequência de *cScrt2(320pb)*. Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pGEM-T(cScrt2-320pb) com o primer T7.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 324 bits (175)	Expect = 5e-93	cSert2(320pb)	
Identities = 189/195 (96%)	Gaps = 4/195 (2%)		NCBI XM_426994 (707pb)
cSert2 (320pb)	126	GGTACCTGCAGCACTGTCCAGGCGCCTGCTGGGTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTG	185
NCBI XM_426994	1	GGTACCTGCAGCACTG-CCTGGCGCCTGCTGGGTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTG	59
cSert2 (320pb)	186	CCGCCAGCACCTCCAGACCCAGGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGA	245
NCBI XM_426994	60	CCGCCAGCACCTCCAGACCC-GGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGA	118
cSert2 (320pb)	246	GAGCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCG-CG-TGACGGACAG	303
NCBI XM_426994	119	GAGCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCGGCGGTGACGGACAG	178
cSert2 (320pb)	304	CTACTCCATGGACGC	318
NCBI XM_426994	179	CTACTCCATGGACGC	193

ANEXO E – Sequenciamento de cSrt2(323pb)

- Primers de clonagem: Fw4/Rv4 (Fig. E1)
- Construção: pGEM-T(cSrt2-323pb)
- Primer de sequenciamento: T7 (Fig. E2)

Figura E1 - Clonagem de *cSrt2(323pb)*. O fragmento de 323 pb foi clonado com os primers Fw4 e Rv4, desenhados sobre a sequência consenso da extremidade 5' de *Srt* em vertebrados (Fig. 7) e de *cSrt2(204pb)*, respectivamente.

Figura E2 - Sequência de *cSrt2(323pb)*. Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pGEM-T(*cSrt2*-323pb) com o primer T7.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 357 bits (193)	Expect = 5e-103	cSert2(323pb)	
Identities = 198/200 (99%)	Gaps = 1/200 (0%)		NCBI XM_426994 (707pb)
cSert2 (323pb)	125	GGTACCTGCAGCACTGCCTGGCGCCTGCTGGCTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTGC	184
NCBI XM_426994	1	GGTACCTGCAGCACTGCCTGGCGCCTGCTGGGTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTGC	60
cSert2 (323pb)	185	CGCCAGCACACTCCAGACCCGGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGAG	244
NCBI XM_426994	61	CGCCAGCAC-CTCCAGACCCGGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGAG	119
cSert2 (323pb)	245	AGCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCGGCGGTGACGGACAGC	304
NCBI XM_426994	120	AGCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCGGCGGTGACGGACAGC	179
cSert2 (323pb)	305	TACTCCATGGACGCCTTCTT	324
NCBI XM_426994	180	TACTCCATGGACGCCTTCTT	199

ANEXO F – Sequenciamento de cSrt2(full)

- Primers de clonagem: EcoRI-Fw8/SmaI-Rv8 (Fig. F1)
- Construção: pMES-GFP(cSrt2)
- Primer de sequenciamento: Rv7 (Fig. F2) e Fw1 (Fig. F3)

Figura F1 - Clonagem de *cSrt2(full)*. O fragmento de 851 pb foi clonado com os primers EcoRI-Fw8 e SmaI-Rv8, desenhados sobre a sequência de *cSrt2(325pb)* e do acesso NCBI XM_426994, respectivamente.

Figura F2 - Sequência de *cSrt2(full)* (1-459). Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pMES-GFP(*cSrt2*) com o primer Rv7.

Figura F3 - Sequência de *cSrt2(full)* (338-831). Cromatograma resultante do sequenciamento do plasmídeo pMES-GFP(*cSrt2*) com o primer Fw1.

Alinhamento BLAST com NCBI XM_426994 (707 pb)

Score = 1295 bits (701)

Expect = 0.0

cSert2(831pb)

Identities = 706/708 (99%)

Gaps = 1/708 (0%)

NCBI XM_426994 (707pb)

```

cSert2(full)   124 GGTACCTGCAGCACTGCCTGGCGCCTGCTGGCTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTGC 183
|||||
NCBI XM_426994   1 GGTACCTGCAGCACTGCCTGGCGCCTGCTGGGTACAACCCCGACAAGAAGCAGGGGCTGC  60

cSert2(full)   184 CGCCAGCACCTCCAGACCCGGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGAGA 243
|||||
NCBI XM_426994   61 CGCCAGCACCTCCAGACCCGGCCTACGCGCCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGATCCCGAGA 120

cSert2(full)   244 GCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCGGCGGTGACGGACAGCT 303
|||||
NCBI XM_426994  121 GCCCCCAGTCCACCTTCTCCGCCCGCTACTTCAACGGGGAGGCGGCGGTGACGGACAGCT 180

cSert2(full)   304 ACTCCATGGACGCTCTTCTTCATCACCGACGGGAGGTTCGCGTCGACGCGGGGAGAGCCAA 363
|||||
NCBI XM_426994  181 ACTCCATGGACGC-CTTCTTCATCACCGACGGGAGGTTCGCGTCGACGCGGGGAGAGCCAA 239

cSert2(full)   364 CGCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGTGCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCC 423
|||||
NCBI XM_426994  240 CGCCGCGGCAGCCACCGCCACTCCTGCCCCGAGTGCGGCAAGACCTACGCCACCTCCTCC 299

cSert2(full)   424 AACCTCAGCCGGCACAAGCAGACCCACCGCAGCCTGGACAGCAAGATGGCCAGGAAGTGC 483
|||||
NCBI XM_426994  300 AACCTCAGCCGGCACAAGCAGACCCACCGCAGCCTGGACAGCAAGATGGCCAGGAAGTGC 359

cSert2(full)   484 CCGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCCGCCCTGGCCATGCACGTCCTCACCAC 543
|||||
NCBI XM_426994  360 CCGACCTGCGGCAAGGCGTACGTCTCCATGCCCGCCCTGGCCATGCACGTCCTCACCAC 419

cSert2(full)   544 AACCTCAAGCACAAGTGCACGTCTGCGGCAAAGCCTTCAGCCGGCCCTGGCTGCTGCAG 603
|||||
NCBI XM_426994  420 AACCTCAAGCACAAGTGCACGTCTGCGGCAAAGCCTTCAGCCGGCCCTGGCTGCTGCAG 479

cSert2(full)   604 GGCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGCTGCTCTCACTGCGGGAAGGCC 663
|||||
NCBI XM_426994  480 GGCCACATGCGTTTCGCACACCGGGGAGAAGCCCTTTGGCTGCTCTCACTGCGGGAAGGCC 539

cSert2(full)   664 TTCGCGACCGCTCCAACCTGCGCGCCCATGCAGACCCACTCCGCCTTCAAGCACTAC 723
|||||
NCBI XM_426994  540 TTCGCGACCGCTCCAACCTGCGCGCCCATGCAGACCCACTCCGCCTTCAAGCACTAC 599

cSert2(full)   724 AAGTGCAAGCAGTGCGAGAAGACCTTCGCCCTCAAGTCGTACCTCAACAAGCACTACGAG 783
|||||
NCBI XM_426994  600 AAGTGCAAGCAGTGCGAGAAGACCTTCGCCCTCAAGTCGTACCTCAACAAGCACTACGAG 659

cSert2(full)   784 TCCGCCTGCTTCAAGGGCTCCGAACACAGCTGTGCAATAGGGAAGTAG 831
|||||
NCBI XM_426994  660 TCCGCCTGCTTCAAGGGCTCCGAACACAGCTGTGCAATAGGGAAGTAG 707

```