RICARDO MORAES BORGES

**CONSTRIÇÃO CELULAR APICAL DURANTE A INVAGINAÇÃO
DO PLACÓIDE DO CRISTALINO EM GALINHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para Obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2008

RICARDO MORAES BORGES

**CONSTRIÇÃO CELULAR APICAL DURANTE A INVAGINAÇÃO
DO PLACÓIDE DO CRISTALINO EM GALINHAS**

Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Chao Yun Irene Yan

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Borges, Ricardo Moraes.

Constricção celular apical durante a invaginação do placóide do cristalino em galinhas / Ricardo Moraes Borges. -- São Paulo, 2008.

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: Embriologia/Biologia do desenvolvimento de vertebrados.

Versão do título para o inglês: Apical cell constriction during chicken lens placode invagination.

Descritores: 1. Placóide do cristalino 2. Invaginação epitelial 3. Constricção celular apical 4. Miosina II não muscular 5. RhoA 6. Morfogênese 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/SBIB162/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Moraes Borges.

Título da Dissertação: Constrição celular apical durante a invaginação do placóide do cristalino em galinhas.

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:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 052 nas fls. 16 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Desenvolvimento, degeneração da retina de vertebrados: aspectos celulares e moleculares**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Carolina Beltrame Del Debbio, Eliane Rossi, Fernanda Siwec, Ize Penhas de Lima, Kelly Cristina Saito, Marcelo Lamers, Márcio Roberto Otávio Gonçalves, Mariane Secco, Marley Januário da Silva, Mônica Aparecida Belmonte, Ricardo Moraes Borges e os pesquisadores Chão Yun Irene Yan, Marinilce Fagundes dos Santos, Alexandre Hiroaki Kihara, Suely da Fátima Parreira, Érica Pereira da Costa,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **02.06.2005**.

São Paulo, 02 de junho de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Vice-Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Irene, a pessoa que me ensinou como trabalhar em um laboratório e Biologia do Desenvolvimento. Desde o estágio de Iniciação Científica, durante o segundo ano de curso de Ciências Biológicas, até a conclusão do Mestrado, foram cinco anos e meio em seu laboratório. Ela não somente me aceitou em seu laboratório como também permitiu que eu pudesse crescer em diversos aspectos, tanto profissionais quanto pessoais. Além de orientadora em tempo integral, ela foi diversas vezes orientadora vocacional e psicóloga, enfim, uma amiga que fez com que eu não desistisse de trilhar o caminho da ciência, em especial, o da Biologia do Desenvolvimento. Sua vontade de ensinar e sua paixão pela Embriologia foram fundamentais em minha decisão de trabalhar em seu laboratório e, em especial, de seguir nesta área. Sei que sou uma pessoa muito difícil de lidar e agradeço pela enorme paciência que ela teve comigo durante todos estes anos em que trabalhamos juntos. Sou muito grato pela confiança que ela depositou em mim para que este trabalho pudesse ser desenvolvido e pela segunda chance que me deu. Também peço desculpas pelos frequentes dias de mal-humor e pelas “pisadas na bola” que cometi durante estes anos. Obrigado.

Após todo este tempo trabalhando no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, convivi com muitos colegas e utilizei equipamentos e reagentes de muitos laboratórios, por isso será bastante difícil lembrar-me de todos. Gostaria de agradecer todos os professores, alunos e funcionários que dividiram desde um bom bate-papo durante o almoço até o equipamento mais caro (em especial, gostaria de agradecer o pessoal da biblioteca, Emília, Ana Lúcia, Marley, Roberto, Cláudio e Celiana, os colegas do Laboratório de Genética e Embriologia Cardíaca do INCOR - Prof Xavier, Tatiana, Michelle, Marilene, Hozana, Marcos, Ana, Roberta, Allysson, Débora -, o Prof Ruy e suas alunas Vanessa e Letícia). Os colegas que participaram das reuniões semanais de laboratórios: Profa Dânia, Andréa, Mônica, Carolina, Kelly, Sandra, Márcio, Loreni, Sayami, Leandro, Suely e Alexandre do Laboratório de Biologia Celular da Retina; Profa Marinilce, Marcelo, Karen, Mara, Virgínia, Adriana, Michelle, Talyta, Erika do Laboratório de Migração Celular; Prof Anselmo, Elen, Cãmila, Hélcio, Marina, Igor, Vanessa, Marcelo Leal e Christofollette, Marcela, Paty do Laboratório de Plasticidade Muscular; e Ize, Eliane, Fernanda, Ana Carolina, Felipe, Leon, Bruno, Cinthia, Antônio do Laboratório de Embriologia Molecular de Vertebrados, do qual faço parte.

Agradeço Enilza Espreafico, pela gentil doação do anticorpo anti-miosina II, Fabio Forti, pela doação do plasmídeo contendo RhoA-DN e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer os meus pais (Luiz Carlos Moraes Borges e Sonia Maria B. de Moraes Borges), os meus irmãos Eduardo e Patricia e os “irmãos” agregados à família (Thaís, Danilo, Alexandre Dutra e Heloísa), que compartilham meu mal-humor diário, que muitas vezes se entusiasmam mais do que eu pelo caminho que eu trilha, pelo apoio fundamental nas horas mais difíceis e pela convivência diária.

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Embriologia Molecular de Vertebrados do
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
bolsa de mestrado, processo número 06/53002-7.

RESUMO

Borges RM. Constrição celular apical durante a invaginação do placóide do cristalino em galinhas [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

O cristalino de vertebrados se origina a partir da invaginação do ectoderme que recobre a vesícula óptica. A invaginação epitelial em diversos modelos é causada pela constrição celular apical, mediada pela contração apical de actina e miosina II e regulada pela GTPase RhoA. Neste trabalho nós investigamos se a invaginação do cristalino em embriões de galinha ocorre devido à constrição celular apical e se este evento é controlado por RhoA. Actina filamentosa e miosina II são expressas na porção apical do cristalino durante a invaginação. Quando a polimerização de actina é inibida por Citocalasina D, o cristalino não invagina, sugerindo que a constrição celular apical poderia contribuir para a invaginação do cristalino. RhoA também é expressa durante o desenvolvimento do cristalino, mas a inibição de RhoA, por eletroporação da forma dominante-negativo, não impediu a invaginação do placóide do cristalino, não alterou a distribuição de miosina II na porção apical do cristalino nem sua ativação, indicando que a invaginação do cristalino independe de RhoA.

Palavras-chave: Placóide do cristalino. Invaginação epitelial. Constrição celular apical. Miosina II não muscular. RhoA. Morfogênese.

ABSTRACT

Borges RM. Apical cell constriction during chicken lens placode invagination [Master thesis (Cell Biology and Histology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Vertebrate lens derives from invagination of the ectoderm that overlies optic vesicles. Epithelial invagination in many model systems is driven by apical cell constriction, mediated by actin and myosin II contraction regulated by GTPase RhoA. Here we investigate the possibility that chick lens placode invagination could also be driven by apical cell constriction and controlled by RhoA. We show that actin and myosin II are expressed at lens apical side during lens invagination. Actin polymerization inhibition by *in ovo* Cytochalasin D treatment prevents lens placode invagination, suggesting that lens placode invagination could be driven by apical cell constriction. RhoA GTPase is also expressed at apical portion of lens placode and during lens invagination. However, when we overexpressed by electroporation the dominant-negative RhoA in the pre-lens ectoderm invagination was not affected. Furthermore, dominant-negative RhoA didn't affect myosin II apical localization nor myosin II phosphorylation, indicating that in lens invagination this process is not regulated by GTPase RhoA.

Key words: Lens placode. Epithelial Invagination. Apical cell constriction. Nonmuscle Myosin II. RhoA. Morphogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localização dos eixos oculares	12
Figura 2.	Desenvolvimento do cristalino	14
Figura 3.	Invaginação do placóide do cristalino	15
Figura 4.	Diferenciação das fibras do cristalino	16
Figura 5.	Modelos propostos para explicar a invaginação epitelial	18
Figura 6.	Movimento intercinético de núcleos no cristalino	20
Figura 7.	A constrição celular apical como mecanismo para a invaginação epitelial ...	22
Figura 8.	Estrutura molecular das Junções Aderentes	24
Figura 9.	Funcionamento das GTPases da família Rho	37
Figura 10.	Descrição do método de eletroporação	38
Figura 11.	Actina filamentosa e miosina II são expressas na porção apical do cristalino antes de iniciar a invaginação (no estágio de placóide do cristalino)	42
Figura 12.	Miosina IIB é expressa na porção apical do placóide do cristalino e durante a invaginação	43
Figura 13.	Miosina Va não está restrita à porção apical do cristalino durante a invaginação	47
Figura 14.	Miosina II presente na porção apical do cristalino está na forma contrátil durante a invaginação	48
Figura 15.	Inibição da polimerização de actina inibe a invaginação do placóide do cristalino	52
Figura 16.	A GTPase RhoA é expressa durante a morfogênese do cristalino	54
Figura 17.	A GTPase RhoA não é necessária para a invaginação do placóide do cristalino	55
Figura 18.	A GTPase RhoA não é necessária para a localização apical de miosina II nem para sua fosforilação	57
Figura 19.	As Junções Aderentes somente se acumulam apicalmente durante a invaginação do cristalino	60
Figura 20.	Modelo para a dinâmica de elementos do citoesqueleto durante a morfogênese do cristalino	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características diagnósticas dos estágios de desenvolvimento do cristalino e a correlação com os estágios Hamburger e Hamilton (HH) e o tempo de incubação necessário para se atingir o estágio indicado.....	31
Tabela 2. Informações dos anticorpos primários utilizados	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Morfogênese do cristalino em vertebrados	13
1.2 O movimento de invaginação epitelial durante o desenvolvimento embrionário	16
1.3 Modelos que explicam a invaginação epitelial	18
1.3.1 Proliferação celular polarizada	19
1.3.2 O movimento intercinético de núcleos e a invaginação epitelial	19
1.3.3 A importância da matriz extra-celular para a invaginação do cristalino	21
1.4 A constrição celular apical como mecanismo para a invaginação epitelial	21
1.4.1 Papel das Junções Aderentes durante a invaginação epitelial	23
1.4.2 A importância de miosina II para a invaginação epitelial	24
1.4.3 Sinalização via RhoA durante a invaginação epitelial	26
1.5 Objetivos	29
 2 MATERIAL E MÉTODOS	 30
2.1 Obtenção de embriões de galinha	30
2.2 Classificação e obtenção dos diversos estágios de desenvolvimento do cristalino ...	30
2.3 Coleta de embriões de galinha	31
2.4 Obtenção de cortes congelados	32
2.5 Obtenção de cortes em parafina e coloração por Hematoxilina-Eosina	32
2.6 Imuno-histoquímica e histoquímica em cortes congelados	33
2.7 Inibição <i>in ovo</i> de actina	34
2.7.1 Preparação do fármaco Citocalasina D	34
2.7.2 Tratamento <i>in ovo</i> com Citocalasina D	35
2.7.3 Reversibilidade do tratamento <i>in ovo</i> com Citocalasina	35
2.8 Eletroporação	36
2.8.1 Elaboração do plasmídeo pCL-GFPa RhoA-DN	37
2.8.2 Eletroporação	37
 3 RESULTADOS	 40
3.1 Actina filamentosa colocaliza com miosina II na porção apical do cristalino antes de a invaginação iniciar e se mantém na porção apical durante todo o processo de invaginação	40
3.2 A localização apical de actina filamentosa e de miosina II é característica específica do cristalino, não ocorrendo no restante do ectoderme	44

3.3 Miosina Va não é expressa na porção apical do cristalino durante a invaginação	44
3.4 A miosina II localizada na porção apical do cristalino está na forma ativada	45
3.5 Actina filamentosa é necessária para a invaginação do placóide do cristalino	48
3.6 A GTPase RhoA é expressa na porção apical do cristalino durante a invaginação ...	53
3.7 Inibição de RhoA não impede a invaginação do placóide do cristalino, não impede a localização apical de miosina II e não altera seu estado de fosforilação	54
3.8 As Junções Aderentes se localizam na porção apical do cristalino somente após o início da invaginação	58
4 DISCUSSÃO	61
4.1 A localização apical dos feixes contráteis de actina e de miosina II durante a invaginação do cristalino sugere que a constrição celular apical pode estar relacionada com a invaginação do cristalino	61
4.2 Extrusões citoplasmáticas presentes na porção apical do cristalino invaginando e a diminuição da distância das junções celulares durante a invaginação sugere a participação da constrição celular apical na morfogênese do cristalino	62
4.3 Inibição da polimerização de actina impede a invaginação do cristalino	63
4.4 Importância de actina filamentosa na regulação das Junções Aderentes apicais e na manutenção da coesão tecidual	65
4.5 Actina filamentosa poderia atuar como restrição física que direciona a invaginação do cristalino	67
4.6 Importância de miosina II para a manutenção da coesão tecidual e para a constrição celular apical	67
4.7 As Junções Aderentes durante a morfogênese do cristalino	70
4.8 Papel de RhoA na invaginação do cristalino	71
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

O olho de um vertebrado funciona como uma câmera fotográfica, pois possui uma lente convergente (formada pelo conjunto da córnea, humor aquoso e cristalino) que refrata e direciona a luz por uma câmara (a câmara posterior do olho, preenchida pelo humor vítreo) fazendo-a incidir sobre uma superfície fotossensível (a retina) para que a imagem seja formada (Gehring, 2001). As diferentes estruturas que formam o olho devem, portanto, estar dispostos em locais específicos para que o olho formado seja funcional. Do ponto de vista embriológico, os diferentes tecidos que formarão o olho devem seguir uma ordem espacial e temporal de desenvolvimento para que estes diferentes tecidos sejam dispostos nos locais corretos, fazendo com que o padrão de olho em forma de câmera seja atingido.

Figura 1 – Localização dos eixos oculares. (A) Corte anatômico transversal de um homem adulto na altura das órbitas oculares mostrando o posicionamento do olho na cabeça. A frente da pessoa está voltada para a direita e o lado direito voltado para baixo. Localização dos eixos proximal-distal e naso-temporal do olho. O eixo dorso-ventral é o eixo ortogonal ao plano do papel. (B) Corte histológico de um olho mostrando as estruturas distais (córnea, câmara anterior, íris e cristalino) e proximais (nervo óptico). Fonte: “*The Visible Human Project*” da “*National Library of Medicine*”, “*National Institute of Health*”, EUA (A); Dr. Fred E. Hossler e Dr. Roger C. Wagner, University of Delaware, EUA (B).

Anatomicamente, o olho possui três eixos: o eixo naso-temporal, que divide o olho nas metades esquerda (porção nasal) e direita (porção temporal) (Fig. 1A); o eixo dorso-ventral, plano horizontal que divide o olho em sua metade superior e inferior; e o eixo antero-posterior (ou eixo próximo-distal), reconhecido pela

presença, na porção anterior (ou distal), da córnea, da câmara anterior do olho (preenchido pelo humor aquoso), da íris e do cristalino e na porção posterior (ou proximal), pela retina e pelo nervo óptico (Fig. 1B).

O cristalino, foco deste trabalho, está situado na porção distal do olho. Trata-se de uma estrutura biconvexa e maciça, que se origina a partir de um tecido epitelial relativamente plano, o ectoderme. Para que o cristalino se forme, durante o desenvolvimento devem ocorrer diversas alterações na morfologia do tecido. As alterações morfológicas que ocorrem com o ectoderme para a formação do cristalino (morfogênese do cristalino) já foram bem descritas, mas ainda restam dúvidas de como as células, individualmente, contribuem para a morfogênese do cristalino.

No presente trabalho pretendemos entender como ocorre a morfogênese inicial do cristalino em nível celular. Especificamente, queremos analisar quais modificações individuais no formato das células que compõem o cristalino são responsáveis pela morfogênese do cristalino como um todo.

1.1 Morfogênese do cristalino em vertebrados

O olho de um vertebrado surge no contexto da neurulação (Fig. 2A-D e A'-D'). Com o fechamento do tubo neural na porção cranial, surgem, bilateralmente na altura do prosencéfalo, as vesículas ópticas (Martinez-Morales et al., 2004). Cada vesícula óptica se expande lateralmente até entrar em contato com o ectoderme subjacente. Após contato com o ectoderme, a vesícula óptica invagina e forma o cálice óptico. O cálice óptico é formado por duas camadas teciduais, a interna, que originará a neuro-retina (NR), tecido nervoso estratificado responsável pela transdução do estímulo luminoso e emissão do sinal nervoso para o nervo óptico, e a camada externa, que originará o epitélio pigmentado retiniano (EPR), importante para a manutenção dos fotorreceptores presentes na NR.

O cristalino tem sua origem a partir do ectoderme superposto à vesícula óptica evaginada do tubo neural (Fig. 2A'-D') (Lovicu e McAvoy, 2005). Inicialmente, o espaço entre o tubo neural e o ectoderme é preenchido por células mesenquimais. Com a evaginação da vesícula óptica, esta desloca as células mesenquimais e entra em íntimo contato com o ectoderme. Neste estágio, o ectoderme que recobre a vesícula óptica (chamado de ectoderme pré-cristalino) é um epitélio simples, formado por células cubóides, morfologicamente indistinto do ectoderme circundante

a não ser por recobrir a vesícula óptica. Apesar da íntima aposição entre vesícula óptica e o ectoderme pré-cristalino, existe um pequeno espaço entre estes dois tecidos, local onde tanto a vesícula óptica quanto o cristalino em desenvolvimento irão depositar a matriz extra-celular, composta principalmente por glicoproteínas e glicosamino-glicanas ácidas (Hendrix e Zwaan, 1975).

Figura 2 – Desenvolvimento do cristalino. A-D embriões de galinha em vista dorsal durante o fechamento do tubo neural e surgimento das vesículas ópticas. Linha tracejada vermelha indica os cortes transversais que são mostrados nos diagramas A'-D'. E-J Diagrama mostrando o desenvolvimento do cristalino (a porção distal do cristalino está voltada para a direita e a dorsal para cima). Com o fechamento do tubo neural (A-C e A'-C'), as vesículas ópticas evaginam do tubo neural e entram em contato com o ectoderme pré-cristalino (D,D'). Após contato com a vesícula óptica, o ectoderme pré-cristalino se espessa e forma o placóide do cristalino (E,F). O placóide do cristalino invagina (G,H) e forma a vesícula do cristalino (I), ao mesmo tempo em que a vesícula óptica invagina para formar o cálice óptico. A vesícula do cristalino se destaca do ectoderme e é posteriormente preenchido pelas proteínas cristalinas (J). VO, vesícula óptica; EPC, epitélio pré-cristalino; PC, placóide do cristalino; CO, cálice óptico; VC, vesícula do cristalino; FC, fibras do cristalino; EP, epitélio do cristalino; NR, neuro-retina; EPR, epitélio pigmentado retiniano. Modificado de Ogino e Yasuda, 2000.

Após contato com a vesícula óptica, as células do ectoderme pré-cristalino alongam-se no sentido basal-apical (que no nível tecidual corresponde ao eixo próximo-distal do ectoderme) (Fig. 2E), pela polimerização de microtúbulos, que formam feixes dispostos ao longo deste eixo (Bancroft e Bellairs, 1977; Messier, 1978; Zwaan et al., 1969). Desta forma, as células se tornam prismáticas e formam um tecido pseudo-estratificado chamado de placóide do cristalino. Neste estágio, o cristalino torna-se morfologicamente diferenciado do ectoderme circundante (Lang, 2004; Lovicu e McAvoy, 2005; McKeehan, 1951; Sullivan et al, 2004; Zwaan et al., 1969).

Figura 3 – Invaginação do placóide do cristalino. Após a formação do placóide do cristalino (A), este invagina inicialmente na porção central do tecido (B – asterisco). Logo, a invaginação se torna assimétrica, com a porção ventral (D-G) formando uma projeção no sentido distal (seta horizontal), enquanto que o lábio dorsal do cristalino (D-G) se projeta ventralmente (seta vertical), indo ao encontro do lábio ventral (D-G). O lábio dorsal se funde com o lábio ventral em uma posição deslocada ventralmente (G - círculo). Dorsal está voltado para cima, ventral para baixo e distal para a direita. Modificado de Schook, 1980a. Barra: 20µm.

O placóide do cristalino invagina, de modo sincronizado com a invaginação da vesícula óptica, até fundir suas bordas e gerar a vesícula do cristalino (Fig. 2G-I). A invaginação do placóide do cristalino se inicia na porção central do tecido (Fig. 3B), mas logo a invaginação adquire um aspecto assimétrico, com a porção dorsal apresentando uma invaginação mais acentuada que a porção ventral. Com a progressão da invaginação, na porção ventral do cristalino surge um lábio que se estende distalmente, enquanto que na porção dorsal, um lábio mais pronunciado surge e em vez de se estender distalmente, ele cresce para a região ventral. O aspecto lateral do placóide nesta etapa é de um “C”. O fechamento do cristalino para formar a vesícula ocorre com o progressivo crescimento do lábio dorsal em direção ao lábio ventral, de modo que o fechamento não ocorre na região central do

cristalino, mas em uma posição deslocada para a região ventral (Fig. 3G) (Schook, 1980a,b).

Durante todo o processo de invaginação, o cristalino permanece conectado ao ectoderme circundante, até que com a formação da vesícula do cristalino, intensa morte celular ocorre na região de contato entre estes dois tecidos, fazendo com que o cristalino se destaque do ectoderme, que passa a recobri-lo. Enquanto a vesícula do cristalino passa por outros processos morfogênicos e de diferenciação celular para a formação de um cristalino maciço (veja abaixo), o ectoderme que agora recobre a vesícula do cristalino se desenvolverá em córnea (Schook, 1980a,b).

Figura 4 – Diferenciação das fibras do cristalino. Após a formação da vesícula do cristalino (A), as células presentes na porção proximal se alongam no sentido distal (B) e obliteram o lúmen da vesícula do cristalino (C). Durante o alongamento, as células depositam as proteínas cristalinas, formando as fibras primárias do cristalino. Neste estágio, as células da porção distal formam o epitélio do cristalino. As células do epitélio do cristalino estão em constante proliferação e migram para a região do equador, alongam-se concentricamente e se diferenciam nas fibras secundárias do cristalino, recobrando as fibras primárias (D,E). Proximal está para a esquerda e distal para a direita. VC, vesícula do cristalino; L, lúmen da vesícula; EC, epitélio do cristalino; FPC, fibras primárias do cristalino; FSC, fibras secundárias do cristalino. Modificado de Gilbert, 2007.

Os próximos passos na formação do cristalino envolvem principalmente a diferenciação dos dois tipos celulares presentes no cristalino: células das fibras primárias, diferenciadas das células mais proximais da vesícula do cristalino e células do epitélio do cristalino, provenientes da porção mais distal da vesícula (Fig. 4). As células das fibras primárias alongam-se em direção ao lúmen da vesícula do cristalino, obliterando-o completamente, enquanto depositam as proteínas cristalinas em seu citoplasma (principalmente alfa e beta-cristalinas em galinhas – Ogino e Yasuda, 2000). Estas fibras são responsáveis pela propriedade de translucidez e refringência do cristalino. As células do epitélio do cristalino, por sua vez, permanecem indiferenciadas e proliferativas, gerando as células das fibras

secundárias, que são adicionadas às fibras primárias durante toda a vida do indivíduo (Lovicu e McAvoy, 2005; Wride, 1996).

1.2 O movimento de invaginação epitelial durante o desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário pode ser entendido como uma combinação de eventos indutivos e morfogenéticos. Enquanto os eventos indutivos são definidos como os processos moleculares que regulam a diferenciação e a identidade celulares, fazendo com que as células adquiram padrões específicos de expressão gênica, a morfogênese é responsável pela alteração do formato tecidual e o correto posicionamento do órgão no corpo adulto.

Figura 5 – Modelos propostos para explicar a invaginação epitelial. (A) A proliferação celular polarizada comprime o epitélio, que se desloca para um lado causando a invaginação. (B) Deslocamento coordenado dos núcleos para a porção basal do epitélio. Com o movimento intercinético de núcleos, as células podem coordenar o deslocamento dos núcleos. A concentração de núcleos na porção basal expande esta porção tecidual, enquanto que a porção apical reduz sua área, causando a invaginação do epitélio. (C) Constrição celular apical. Com a redução ativa da porção apical das células, o tecido como um todo tem sua área apical diminuída e a basal expandida, causando a invaginação. A porção apical está voltada para a direita e basal para a esquerda.

Um dos modelos bastante investigados de morfogênese que ocorre durante o desenvolvimento embrionário é a invaginação epitelial. A invaginação de um epitélio ocorre quando um tecido modifica sua forma para gerar uma estrutura com uma

porção côncava, em geral, derivada da porção apical do epitélio, enquanto que a porção oposta, a basal, se torna convexa (Fig. 5).

A invaginação epitelial ocorre em diversos tipos epiteliais de embriões das mais diversas espécies. Por exemplo, a invaginação está envolvida na formação do mesoderme de *Drosophila* e de ouriço do mar, durante a gastrulação (revisto em Kominami e Takata, 2004; Pilot e Lecuit, 2005) e durante a formação das glândulas salivares em *Drosophila* (Nikolaidou et al., 2004). Nestes casos, os três são epitélios simples. A invaginação ocorre também em epitélios estratificados, como durante a formação do mesoderme em *Xenopus*, na gastrulação (Lee e Harland, 2007) e em epitélios pseudoestratificados, como na formação do tubo neural a partir da placa neural em vertebrados (Kinoshita et al., 2008) e da formação das vesículas ótica, adenohipofisária e olfatória a partir dos placóides craniais, também em vertebrados (Sai e Ladher, 2008; Schlosser, 2006). Conforme mencionado anteriormente, no contexto do desenvolvimento do cristalino, a invaginação epitelial é uma das etapas do processo morfogenético que contribui para a formação da vesícula do cristalino a partir do placóide do cristalino.

1.3 Modelos que explicam a invaginação epitelial

Diversos mecanismos celulares têm sido propostos para explicar a invaginação epitelial. Estes mecanismos podem ser separados em duas categorias principais: mecanismos no qual o início da invaginação é causado por mecanismos extrínsecos, ou seja, quando as forças que fazem o tecido invaginar são externas ao epitélio e mecanismos intrínsecos, quando a força para a invaginação provém do próprio epitélio (Colas e Schoenwolf, 2001). Dentre os mecanismos extrínsecos que regulam a invaginação epitelial podemos citar, principalmente, a proliferação polarizada do tecido que circunda o epitélio (Fig. 5A), enquanto que alguns dos mecanismos intrínsecos são: (1) o aumento do volume no pólo basal das células em relação ao pólo apical, provocado pelo deslocamento coordenado dos núcleos celulares para a porção basal (Fig. 5B), e (2) a constrição celular apical, mecanismo envolvendo a contração da porção apical das células para a formação das células garrafas (Fig. 5C) (Hendrix, 1993; Schök e Perrimon, 2002; Schook, 1980a,b).

É importante ressaltar que a invaginação epitelial está envolvida com a formação de diversos órgãos, e pode-se generalizar, que em nenhum caso um

mecanismo age isolado para regular a invaginação, apesar de ser possível identificar a contribuição destes diversos mecanismos para a invaginação de um determinado tecido.

1.3.1 Proliferação celular polarizada

Neste modelo, o tecido contínuo ao epitélio que irá invaginar prolifera de maneira polarizada, ou seja, as células alinham os fusos mitóticos em um único eixo, fazendo com que o tecido cresça em um único sentido, gerando uma força que empurra o epitélio. Se o epitélio for flanqueado por tecido que apresenta a proliferação polarizada, a força gerada pela proliferação faz o epitélio se deslocar para o lado, causando a invaginação (Fig. 5A). Este mecanismo foi descrito, por exemplo, no peixe *Danio rerio*. Durante a neurulação, as células do epiblasto que antes apresentavam os fusos mitóticos no sentido antero-posterior, mudam o eixo mitótico para a região médio-lateral, fazendo com que o crescimento do epiblasto ocorra no sentido da placa neural, forçando-a a invaginar (Concha e Adams, 1998). O mesmo mecanismo ocorre durante o fechamento do tubo neural em galinhas. Neste caso, se o ectoderme lateral ao tubo neural é removido antes da invaginação ser iniciada, a formação correta do tubo neural é inibida, sugerindo que o fechamento do tubo neural depende parcialmente da pressão lateral exercida pela proliferação do ectoderma não-neural circundante (Colas e Schoenwolf, 2001; Hackett et al., 1997).

1.3.2 O movimento intercinético de núcleos e a invaginação epitelial

Tanto o placóide quanto a vesícula do cristalino são epitélios pseudoestratificados que apresentam o movimento intercinético de núcleos. Este processo foi originalmente descrito no neuroepitélio do tubo neural, mas ocorre em diversos outros epitélios embrionários, entre eles o cristalino em desenvolvimento. Neste processo, os núcleos das células migram da porção basal para a apical conforme avançam no ciclo de divisão celular.

Durante a fase G1, o núcleo se desloca para a região basal, onde permanece durante toda a fase S, e depois retorna para a superfície apical durante a fase M. A

forma da célula acompanha a posição do núcleo, acumulando citoplasma na região basal quando na fase S e na região apical durante a fase mitótica (Fig. 6).

Figura 6 – Movimento intercinético de núcleos no cristalino. No cristalino, as células deslocam seu núcleo para a porção apical do tecido, conforme avançam no ciclo celular. Quando os núcleos se encontram na porção basal, as células estão na fase S e ao atingir a porção apical, as células entram em mitose. Modificado de Messier, 1978.

O movimento intercinético de núcleos foi descrito em diversos outros epitélios pseudoestratificados e foi sugerido que este mecanismo poderia servir como força-motriz para a invaginação epitelial. Por exemplo, a migração intercinética ocorre no mesoderme durante a gastrulação de *Drosophila melanogaster* e no desenvolvimento do epitélio hepático (Bort et al., 2006; Kam et al, 1991). Em *Drosophila*, foi demonstrado que a migração do núcleo para a extremidade basal coincide com a contração apical necessária para a invaginação inicial do sulco ventral durante a gastrulação (Kam et al., 1991).

A migração intercinética também poderia contribuir para a invaginação do placóide do cristalino: como a maior parte do tempo do ciclo celular é gasto com a fase S, que dura cerca de 5 horas no placóide do cristalino, em contraponto com a fase mitótica, que dura somente 0,5 hora (Zwaan e Hendrix, 1973), a maior parte dos núcleos celulares se encontram na região basal, e portanto, geram um formato celular cônico, com a menor superfície celular voltada para a porção apical do tecido. A sincronização de várias células na fase S em regiões específicas do placóide poderia gerar um acúmulo de células cônicas, causando uma expansão na porção basal do tecido, enquanto que a porção apical apresenta área reduzida, culminando na invaginação daquela região (Fig. 5B) (Messier, 1978).

1.3.3 A importância da matriz extra-celular para a invaginação do cristalino

Durante o período de contato entre a vesícula óptica e o cristalino, matriz extra-celular é depositada no vão formado pela aposição destes dois tecidos. A interação do cristalino com a matriz extra-celular apresenta papel importante para a morfogênese do cristalino. Camundongos com afaquia congênita (animais com ausência de cristalino) apresentam alterações na composição desta matriz extra-celular (Zwaan e Webster, 1984). Além disso, a injeção de inibidores da síntese de glicosaminoglicanas, ou de enzimas que degradam proteoglicanas, no espaço entre a vesícula e o placóide, interferem na invaginação do cristalino (Gato et al., 2001). Outros placóides também parecem depender da matriz extra-celular para invaginar, como o placóide ótico. A injeção de anticorpos anti-laminina e anti-integrina causam dissociação da vesícula ótica do tubo neural e impede sua invaginação (Visconti e Hilfer, 2002).

Uma possível função direta da matriz extra-celular durante a morfogênese inicial do cristalino é a adesão do placóide a vesícula óptica atrelando a invaginação dos dois. A importância da conexão física do placóide com a vesícula é particularmente evidente em camundongos. Nestes animais, a adesão dos dois tecidos ocorre através de diversos processos celulares que são emitidos da porção basal do cristalino e se direcionam para a matriz extra-celular e eventualmente coalescem com processos emitidos pela vesícula óptica (Lovicu e McAvoy, 2005; Richard Lang, comunicação pessoal). A adesão entre estes dois tecidos poderia contribuir com a invaginação do cristalino, ao utilizar de forma passiva, a força exercida pela invaginação da vesícula óptica.

Alternativamente, como a matriz extra-celular é componente importante na sinalização celular via integrinas e por acumular ligantes extra-celulares, esta poderia servir de centro de sinalização, disponibilizando ligantes para que ajam em receptores de membrana presentes no cristalino.

1.4 A constrição celular apical como mecanismo para a invaginação epitelial

Neste modelo, a invaginação epitelial ocorre devido ao somatório das reduções apicais individuais das células que compõe o epitélio causada pela contração de elementos do citoesqueleto (Fig. 7).

Figura 7 – A constrição celular apical como mecanismo para a invaginação epitelial. (A) A constrição do ápice celular provocado por actina e miosina, faz com que a célula mude de forma, de prismática para cônica. (B) Se essa mudança de forma ocorrer em um grupo de células que permanecem aderidas, o somatório da mudança de forma de cada célula provoca a invaginação do epitélio. Porção apical do tecido está para a direita, porção basal para a esquerda. Setas vermelhas indicam o movimento de contração causado por actina e miosina. Em verde está a distribuição de actina, miosina e Junções Aderentes na porção apical das células. Modificado de Pilot e Lecuit, 2005.

Por exemplo, durante a gastrulação de *Drosophila*, as células do futuro mesoderma formam uma monocamada colunar que contraem concomitantemente suas regiões apicais, fazendo o tecido invaginar para formar o sulco ventral (Young et al., 1991). Um fenômeno semelhante ocorre durante a gastrulação do ouriço do mar: as células da placa vegetal que formarão o blastóporo aumentam o seu eixo apico-basal e contraem o pólo apical, curvando a placa vegetal na direção da blastocele. Estes eventos são correlacionados com a localização polarizada e contração coordenada de microfilamentos (revisto em Jacinto e Baum, 2003; Marston e Goldstein, 2006; Nakajima e Burke, 1996; Pilot e Lecuit, 2005; Quintin et al., 2008; Young et al., 1991).

Actina se polimeriza na porção apical das células, formando um cinturão que fica ancorado às membranas através de interações com complexos protéicos de junção célula-célula, como as Junções Aderentes (Conti e Adelstein, 2008; Fukata e Kaibuchi, 2001). A miosina II, quando ativada por fosforilação na cadeia leve, aproxima os filamentos de actina, e indiretamente, as membranas celulares, ligadas à actina via porção citoplasmática da Junção Aderente. Este movimento reduz o perímetro celular apical e gera uma forma celular cônica. No contexto do tecido epitelial, as células não perdem contato com as células vizinhas, e com o acúmulo de células com o formato cônico, o epitélio reduz a região apical causando a invaginação.

No contexto da gastrulação de *Drosophila*, ou de *Xenopus*, se a polimerização da actina ou a ação da miosina II na região apical são inibidas, a invaginação do mesoderme não ocorre (Dawes-Hoang et al., 2005; Lee e Harland, 2007). Além disto, se beta-catenina (componente importante das Junções Aderentes - veja abaixo) é mutagenizada de forma a impedir a interação da actina com o complexo juncional, a gastrulação de *Drosophila* também não ocorre (Dawes-Hoang et al., 2005; Cox et al., 1996). Neste caso, sugere-se que a miosina II continua agindo sobre a actina, mas como esta não está ancorada na membrana, ela é incapaz de reduzir o perímetro apical da célula. Em conjunto, estes dados ilustram a importância dos filamentos de actomiosina e de seu ancoramento às Junções Aderentes no mecanismo de constrição celular apical.

1.4.1 Papel das Junções Aderentes durante a invaginação epitelial

Além do papel mencionado acima das Junções Aderentes na constrição celular apical, as Junções Aderentes também são peças importantes na manutenção da adesão inter-celular, necessária para que o somatório da deformação apical de células individuais seja coordenado e transmitido para o epitélio como um todo. Desta forma, o tecido se deforma como um corpo único, com a região apical na superfície côncava e a região basal na superfície convexa. A dualidade de função das Junções Aderentes provém da sua composição.

As Junções Aderentes são formadas pelas proteínas transmembrana caderinas, que se ligam em seu domínio externo a outras caderinas, proporcionando a adesão celular. Em sua porção citoplasmática, caderinas se ligam a beta-catenina e a alfa-catenina, entre outras proteínas. Alfa-catenina possui papel importante no complexo de adesão celular por se ligar também ao citoesqueleto de actina (Fig. 8A). As caderinas também podem se ligar lateralmente a outras caderinas presentes em uma mesma membrana, formando agrupamentos de complexos caderina-catenina, o que reforça a adesão celular (Fig. 8B) (Fukata e Kaibuchi, 2001; Gumbiner, 2000, 2005; Kaibuchi et al., 1999; Noritake et al., 2005; revisto em Yap e Gumbiner, 1997).

Ao se associar ao complexo de adesão formado por caderina e cateninas, a actina filamentosa serve como elemento fundamental no agrupamento das caderinas nas membranas, impedindo a difusão dos complexos juncionais no plano das

membranas, ou que estes sejam endocitados (Ivanov et al., 2004, 2007). Embora o modelo tradicional de ligação direta do citoesqueleto de actina com elementos das Junções Aderentes via alfa-catenina esteja sendo revisto (Drees et al., 2005; Weis e Nelson, 2006; Yamada et al., 2005), a presença do citoesqueleto de actina é imprescindível para iniciar a formação das Junções Aderentes, para agrupar os complexos de adesão celular e para reforçar a adesão celular (Fig. 8).

Figura 8 – Estrutura molecular das Junções Aderentes. Caderina é a proteína transmembrana que promove a adesão celular propriamente dita, ao se ligar a caderinas presentes nas membranas de outra célula (A). No citoplasma, caderina se liga a beta-catenina, e esta se liga a alfa-catenina. O citoesqueleto de actina se liga ao complexo de adesão via alfa-catenina, segundo o modelo tradicional, estabilizando o complexo na membrana e reforçando a adesão celular. Caderina também pode formar agrupamentos ao se ligar lateralmente a caderinas presentes na mesma membrana (B). Neste caso, a maior quantidade de caderinas associadas permite que a adesão celular seja reforçada. Actina se associaria ao complexo de adesão celular, ancorando os complexos caderina-catenina nos agrupamentos e evitando que estes se desloquem lateralmente pela membrana. Modificado de Weiss et al., 2006.

1.4.2 A importância de miosina II para a invaginação epitelial

Miosina da classe II inclui a miosina presente nos músculos cardíaco, esquelético e liso e a miosina não-muscular, esta última presente em qualquer tipo celular e que desempenha papel fundamental em diversos processos celulares, como citocinese, migração, adesão, entre outros. Em mamíferos, foram identificados três subtipos de miosina II não-muscular: miosina IIA, IIB e IIC (revisto em Conti e

Adelstein, 2007; Golomb et al., 2004). A distribuição das três isoformas coincidem em estágios embrionários mais precoces, mas emergem com padrões de expressão distintos em estágios posteriores (Golomb et al., 2004). Em particular, a miosina IIC é mais expressa em tecidos diferenciados, e sua presença em embriões é menor que as outras duas isoformas. A miosina IIA transloca filamentos de actina a praticamente três vezes a velocidade de miosina IIB e IIC (Golomb et al., 2004). Além disto, durante o ciclo cinético, a interação da miosina IIB com a actina perdura mais que a interação miosina IIA-actina (Kovacs et al., 2003; Wang et al., 2003). Em conjunto, os dados bioquímicos e de padrão de expressão sugerem que a diferença na distribuição das isoformas provavelmente reflete uma diferença funcional derivada das suas propriedades bioquímicas e que cada isoforma exerce um papel celular distinto. De fato, a miosina IIA tem sido mais freqüentemente associada com eventos de contração rápida de actina enquanto que a miosina IIB tem sido relacionada com funções estruturais tais como manutenção de tensão e adesividade intercelular (Ma et al., 2007).

As três isoformas de miosina II têm em comum a sua composição protéica: todas são compostas por um par de cadeias pesadas (com peso molecular de 230 kDa) e dois pares de cadeias leves (um par com 17 kDa e o outro par com 20 kDa). As cadeias pesadas de miosina II se polimerizam para formar os feixes de miosina e possuem afinidade por actina, causando a aproximação de dois filamentos de actina ao hidrolisar ATP. As cadeias leves de peso molecular de 20 kDa, também conhecidas como cadeias leves regulatórias de miosina, abrigam os sítios de regulação da atividade contrátil de miosina II. A serina na posição 19 da cadeia leve é de particular importância. Sua fosforilação estimula a atividade ATPásica dependente de actina e é considerado indicativo da ativação da capacidade contrátil da miosina II (Kamisoyama et al., 1994). Mais recentemente, a fosforilação na serina 19 de miosina II também tem sido associada com o desempenho de funções estruturais. Por exemplo, a formação de feixes de actina em regiões circunvizinhas a Junções Aderentes depende da fosforilação da serina 19 (Shewan et al., 2005). Contudo, neste trabalho, não foi especificado qual a isoforma de miosina II relevante para este papel. Todas as três isoformas de miosina II foram encontradas em regiões enriquecidas de Junções Aderentes (Ivanov et al., 2007). Por fim, a atividade contrátil da miosina IIA é necessária para o remodelamento das Junções Aderentes (Ivanov et al., 2007). Em conjunto, estes dados sugerem que além da função

clássica contrátil, as miosinas II também tem uma função estrutural, contribuindo de forma importante na dinâmica e na manutenção de Junções Aderentes intercelulares.

O controle da fosforilação de serina 19 nas miosinas resulta do somatório de atividades de cinases e fosfatases sobre este resíduo. A fosforilação direta é atribuída à ação de três cinases: a Cinase de Cadeia Leve da Miosina dependente de Cálcio-calmodulina (*calcium-calmodulin-dependent MLC kinase*; MLCK), a Rho Cinase (Rock) e a Proteína Cinase Ativada por AMP (revisto em Conti e Adelstein, 2007). Por outro lado, a defosforilação desta serina é catalisada pela Miosina Fosfatase (MYPT), cuja atividade também é controlada via fosforilação. A via de Rho/Rock aumenta a atividade da miosina II de duas formas: diretamente, via fosforilação da serina 19, e indiretamente através da inibição da atividade da MYPT (Amano et al., 1996; revisto em Matsumura, 2005).

1.4.3 Sinalização via RhoA durante a invaginação epitelial

RhoA é uma GTPase, membro da família de GTPases Rho. A família de GTPases Rho inclui as subfamílias Rac e Cdc, que contém as GTPases Rac1 e Cdc42, respectivamente (Burridge e Wennerberg, 2004; revisto em Sahai e Marshall, 2002). Como qualquer GTPase, RhoA cicla entre uma forma ativa, quando ligada a GTP e uma forma inativa, quando ligada a GDP. As proteínas que fazem RhoA ciclar entre as formas ativa e inativa são as GEFs (do inglês *guanine exchange factors*) e as GAPs (do inglês *GTPase activating proteins*). As proteínas GEF induzem a liberação do GDP ligado a RhoA e permitem a ligação de GTP, ativando RhoA. GAPs induzem a hidrólise do GTP ligado a RhoA, inativando-a. Outras características importantes de RhoA é que quando ativa, RhoA permanece associada à membrana plasmática, onde se associa a diferentes proteínas efetoras, que vão regular diversos aspectos do comportamento celular, como mudança de forma, citocinese, migração e adesão (Etienne-Manneville e Hall, 2002). RhoA pode ainda, se ligar a GDIs (do inglês *Rho-GDP dissociation inhibitor*), que se liga a RhoA inativo e o sequestra no citoplasma, impedindo que este possa ser ativado pela ação de GEF (Etienne-Manneville e Hall, 2002).

Figura 9 – Funcionamento das GTPases da família Rho. Rho cicla entre as formas ativa (RhoGTP) e inativa (RhoGDP). Quando se torna ativa, Rho se localiza na membrana plasmática e fosforila seus efetores, entre eles Rock, que é capaz de fosforilar diversos componentes do citoesqueleto. RhoGAP catalisa a hidrólise de ATP, inativando Rho e mantendo-o no citoplasma associado a RhoGDI. RhoGEF catalisa a dissociação de GDP de Rho e permite a ligação a GTP re-ativando Rho. Modificado de Kaibuchi et al., 1999.

RhoA quando ativa, se encontra inserido na membrana plasmática, e é capaz de interagir com diversas moléculas que regulam o citoesqueleto, entre elas, os efetores Rock e forminas. Conforme mencionado anteriormente, Rock regula a ação contrátil de miosina II ao fosforila-la na cadeia leve regulatória, tornando-a capaz de contração e de formar filamentos (revisto em Conti e Adelstein, 2008). Adicionalmente, Rock ativa miosina II ao inibir sua defosforilação pela ação de Miosina Fosfatase (MYPT). Outro efector bastante conhecido de RhoA são as forminas, responsáveis por promover a polimerização não ramificada de actina (Burridge e Wennerberg, 2004; Paavilainen et al., 2004; Winder e Ayscough, 2005).

No contexto da invaginação epitelial e da constrição celular apical, foi demonstrado que RhoA é suficiente e necessário para a invaginação do mesoderme em *Drosophila* e em ouriço do mar (Beane et al., 2006; Dawes-Hoang et al., 2005; Lee e Harland, 2007). Quando a forma dominante negativo de RhoA é super-expresso em ouriço do mar, o mesoderme não invagina, provavelmente porque as células garrafas não se formam. Em *Drosophila*, mutantes para Rock ou para seu ativador RhoGEF também não invaginam o mesoderme porque miosina II deixa de se concentrar na porção apical (Dawes-Hoang et al., 2005; Lee e Harland, 2007; Nikolaidou et al., 2004).

RhoA também é necessário para a invaginação dos segmentos corpóreos durante o desenvolvimento de *Drosophila* (Homem e Peifer, 2008; Mulinari et al.,

2008). Mutantes para RhoGEF, ativador da via RhoA, apresentam diminuição da invaginação nos segmentos corpóreos, enquanto que a super-expressão de RhoGEF lateralmente aos segmentos corpóreos (tecido que normalmente não invagina), é capaz de induzir invaginação ectópica. Foi demonstrado neste contexto, que a super-expressão da formina Dia1 também é capaz de causar a invaginação ectópica, e que sua mutação inibe a invaginação dos segmentos corpóreos de maneira semelhante ao mutante RhoGEF. Nestes casos, foi demonstrada uma irregularidade na localização apical de actina filamentosa (Homem e Peifer, 2008; Mulinari et al., 2008), sugerindo a participação de RhoA na invaginação epitelial também via forminas, regulando o citoesqueleto de actina apical.

O mecanismo de constrição celular apical tem sido envolvido em uma gama cada vez maior de epitélios, e em todos eles, existe uma conservação no mecanismo molecular que controla este processo morfogênético. Em todos estes casos, a sinalização via RhoA foi descrita como importante para a regulação do citoesqueleto que leva à invaginação, regulando tanto o recrutamento apical de miosina II quanto sua ativação e a formação de filamentos de actina na porção apical do epitélio (Homem e Peifer, 2008; Kinoshita et al., 2008; Mulinari et al., 2008; Nikolaidou et al., 2004; Sai e Ladher, 2008).

1.5 Objetivos

Neste trabalho analisamos se a constrição celular apical contribui para a invaginação do placóide do cristalino em embriões de galinha. Para isso, iniciamos com a caracterização espacial e temporal dos elementos contráteis actina filamentosa e miosina II durante a morfogênese do cristalino, para verificar se os elementos contráteis estariam presentes na porção apical do cristalino antes de a invaginação iniciar. Verificamos, também, se a presença apical dos filamentos contráteis de actina e miosina II seriam necessários para a invaginação do placóide do cristalino. Finalmente, verificamos se a GTPase RhoA poderia estar envolvida com o mecanismo de invaginação do cristalino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de embriões de galinha

Ovos fertilizados de galinha da raça White Leghorn foram adquiridos da Granja Kunitomo, situado à cidade de Mogi das Cruzes, São Paulo. Os ovos foram incubados a 38 °C e 50% de umidade relativa do ar por 33 a 50 horas, para se obter embriões com o cristalino em diferentes estágios de desenvolvimento - ectoderme pré-cristalino, placóide do cristalino ou cristalino invaginando.

2.2 Classificação e obtenção dos diversos estágios de desenvolvimento do cristalino

Os cristalinos em desenvolvimento foram agrupados em três categorias, segundo características morfológicas observáveis sob microscópio estereoscópio:

(1) Ectoderme pré-cristalino: neste estágio, a vesícula óptica evaginou do tubo neural e está em contato com o ectoderme sobrejacente, o qual originará o cristalino. Observado dorsalmente, o ectoderme pré-cristalino é morfológicamente igual ao restante do ectoderme que circunda o embrião, sendo diferenciado apenas por recobrir a vesícula óptica. Este estágio de desenvolvimento do cristalino é encontrado em embriões que contém de 10 a 16 somitos.

(2) Placóide do cristalino: o ectoderme pré-cristalino que recobre a vesícula óptica se espessou, formando um placóide. Visto dorsalmente, sob microscópio estereoscópio, o placóide do cristalino pode ser diferenciado do restante do ectoderme por ser mais espesso no sentido próximo-distal. Segundo McKeehan (1951), em embriões de galinha, o alongamento das células do ectoderme pré-cristalino para formar o placóide do cristalino se inicia a partir do estágio embrionário de 16 somitos e atinge seu grau máximo de alongamento no estágio de 21 somitos.

(3) Cristalino invaginando: o placóide invagina, sendo que sua porção distal, antes convexa, torna-se côncava, formando uma estrutura em forma de “C”. A invaginação do placóide do cristalino se inicia em embriões com 22 somitos (McKeehan, 1951).

Para se obter embriões de galinha com o cristalino em estágio de ectoderme pré-cristalino (embriões com 10 a 16 somitos, o que corresponde ao estágio Hamburger e Hamilton 10 a 12) os ovos foram incubados por 33 a 45 horas, para

obtenção de placóide do cristalino (18 a 21 somitos; HH 12 e 13) o tempo de incubação foi de 45 a 48 horas e para cristalino invaginando (22 somitos; HH 14), 50 horas, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

A tabela a seguir resume a correlação entre os estágios de desenvolvimento do cristalino, suas características diagnósticas, os estágios HH (baseados no número de somitos) para referências com a literatura e o tempo de incubação necessário para se chegar ao estágio desejado.

Tabela 1 – Características diagnósticas dos estágios de desenvolvimento do cristalino e correlação com os estágios Hamburger e Hamilton (HH) e o tempo de incubação necessário para se atingir o estágio indicado.

	Estágio HH	Horas de incubação	Número somitos	Características diagnósticas
Ectoderme pré-cristalino	10 a 12	33 a 45	10 a 16	- Vesícula óptica completamente evaginada do tubo neural e aderida ao ectoderme sobrejacente (ectoderme pré-cristalino). - Ectoderme pré-cristalino sem distinção morfológica do restante do ectoderme que recobre o embrião.
Placóide do cristalino	12 e 13	45 a 48	18 a 21	- Células do ectoderme que recobrem a vesícula óptica estão mais alongadas que o restante do ectoderme. É possível observar, em vista dorsal, o espessamento no sentido próximo-distal do placóide.
Cristalino Invaginando	14	50	22	- Cristalino em forma de “C”, quando visto dorsalmente.

2.3 Coleta de embriões de galinha

Os embriões de galinha foram coletados conforme protocolo de Chapman et al. 2001. Neste protocolo, a coleta é feita com o auxílio de qualquer papel-filtro qualitativo, cortado em quadrados de 2,5 cm de aresta e com um orifício central em forma de “+”, formado por 4 furos de 6 mm de diâmetro semi-sobrepostos, feitos com um perfurador de papel. Os ovos fertilizados e incubados foram quebrados em um prato sem deixar romper a gema e tomando o cuidado para deixar o embrião voltado para cima. O papel-filtro foi colocado sobre a gema, posicionando o orifício do papel-filtro sobre o embrião.

Com uma tesoura, a membrana vitelínica que encerra a gema foi recortada em torno do papel-filtro, e o embrião, aderido ao papel-filtro através das membranas vitelínica e extra-embrionárias, foi transferido para placa de Petri contendo PBS (solução salina tamponada com fosfato) para remoção do excesso de vitelo.

2.4 Obtenção de cortes congelados

Os embriões foram coletados pelo método de papel-filtro (veja seção 2.3) e estagiados para correta avaliação do estágio de desenvolvimento do cristalino (veja seção 2.2). As cabeças dos embriões foram seccionadas do tronco na altura da vesícula ótica, transferidas com pipeta de vidro para solução de crioproteção (sacarose 20%) e mantidos a 4 °C por 1h ou 2h, respectivamente para embriões em estágios até HH 13, e para os embriões em estágios acima de HH 13. As cabeças foram incluídas em OCT (Sakura) diluído em sacarose 20% na proporção de 1:1, e o congelamento do material foi realizado com auxílio de gelo seco. Os cristalinos foram seccionados em criostato no sentido dorso-ventral do olho em seções de 10 µm e os cortes foram recuperados em lâminas de vidro (Fisher) previamente gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram guardadas a -20 °C para evitar deterioração do material.

2.5 Obtenção de cortes em parafina e coloração por Hematoxilina-Eosina

Os embriões foram fixados em solução de Carnoy por 2 minutos, para embriões em estágio até HH 13 e por 5 minutos para embriões em estágios acima de HH 13. A desidratação foi feita em série crescente de álcool etílico (Synth - 70%, 95% e 2 vezes de 100% por 20 minutos cada), diafanizados com solução de xilol (Synth) / álcool etílico 100% na proporção de 1:1 por 20 minutos e posteriormente com 2 banhos de xilol por 20 minutos cada. Os embriões foram infiltrados por *paraplast* (Fisher) com 3 banhos de 1 hora cada e incluídos em *paraplast* para serem cortados em micrótomo, com 5 µm de espessura.

Para coloração com Hematoxilina-Eosina, as lâminas foram desparafinizadas com 2 banhos de xilol de 10 minutos cada e solução de xilol / álcool etílico 100% na proporção de 1:1 por 10 minutos. Os cortes foram re-hidratados com série decrescente de álcool etílico (100%, 95% e 70% por 10 minutos cada) e finalmente

com água destilada por 5 minutos. Hematoxilina (Dinâmica Reagentes Analíticos) pré-filtrada foi aplicada nas lâminas por 1 minuto e lavada em água corrente até que o corante adquirisse a coloração azulada. As lâminas foram incubadas com Eosina de Harris (Dinâmica Reagentes Analíticos) por 40 segundos e o corante removido mergulhando-se rapidamente as lâminas em água destilada e depois em álcool etílico 95%. Finalmente, os cortes foram desidratados com 2 banhos de álcool etílico 100% e com 3 banhos de xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas em *permount* (Merck) e fotografados em microscópio de luz.

2.6 Imuno-histoquímica e histoquímica em cortes congelados

As lâminas contendo os cortes congelados foram deixadas na horizontal por 30 minutos a 37 °C para que o OCT secasse e os cortes aderissem às lâminas. Os cortes foram fixados em PFA 4% (paraformaldeído, Sigma) por 20 minutos e lavados por 3 vezes em PBS por 10 minutos cada para remover o OCT e o fixador.

Para impedir a ligação dos anticorpos a epítomos inespecíficos, os cortes foram bloqueados com solução de PBST 0,1% (PBS contendo 0,1% de Triton X-100, Sigma) com NGS 3% (soro normal de cabra, Jackson ImmunoResearch) e BSA 1% (albumina sérica de bovinos, Jackson ImmunoResearch) por 1h a temperatura ambiente e em câmara úmida. Os anticorpos primários foram diluídos em PBST 0,1% contendo NGS a 3%, e aplicados sobre os cortes (5 µl por corte) por 2h a temperatura ambiente e em câmara úmida. A tabela 2 resume as informações dos anticorpos primários utilizados neste trabalho.

Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 10 minutos e incubadas com anticorpos secundários diluídos em PBST 0,1% por 2h a temperatura ambiente e em câmara úmida. Os seguintes anticorpos secundários foram utilizados: anticorpo contra IgG de coelho produzido em cabra e conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes, EUA, diluição 1:1000), ou Tritc (Sigma, EUA, diluição 1:50) e anticorpo contra IgG de camundongo produzido em cabra e conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes, EUA, diluição 1:1000) ou TRITC (Sigma, EUA, diluição 1:50).

Tabela 2 – Informações dos anticorpos primários utilizados.

Animal fornecedor do anticorpo	Nome da proteína com a qual o anticorpo reage	Concentração de anticorpo utilizada	Fornecedor
coelho	Miosina II	1,6 µg/ml	Doação Dr. Espreafico e Dr. Larson, Universidade de São Paulo/RP
coelho	Miosina II (Ser19)	1:50	<i>Cell Signaling Technology</i> , EUA
camundongo	Miosina II B	2,0 µg/ml	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> , EUA
coelho	Miosina Va	2,0 µg/ml	Doação Dr. Espreafico e Dr. Larson, Universidade de São Paulo/RP
coelho	pan-Caderina	1,25 µg/ml	<i>Zymed Laboratories</i> , EUA
camundongo	Beta-catenina	1,25 µg/ml	<i>BD Biosciences</i> , EUA
coelho	RhoA	2,0 µg/ml	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EUA
coelho	Rac1	4,0 µg/ml	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EUA
coelho	Cdc42	4,0 µg/ml	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , EUA

As lâminas foram novamente lavadas em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada para remoção dos anticorpos secundários não ligados. Realizada a imunohistoquímica, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e em câmara úmida com Faloidina conjugada aos fluoróforos rodamina ou Alexa 488 (Molecular Probes, EUA, diluição 1:100) diluída em PBST 0,1% para marcação de actina filamentosa. O excesso de Faloidina foi removida lavando-se as lâminas em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas em *Vecta Shield* (Vector Laboratories, EUA) e fotografadas em microscópio confocal Nikon PCM2000 ou Zeiss 510 Meta.

2.7 Inibição *in ovo* de actina

2.7.1 Preparação do fármaco Citocalasina D

Citocalasina D (Sigma), inibidor da polimerização de actina, foi solubilizado em DMSO (Sigma) e mantido em estoque a -20 °C com concentração de 100 mM (aproximadamente 50 µg/µl) protegido da luz para evitar sua degradação (Quinlan et al., 2004). As concentrações finais utilizadas para os experimentos foram 1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml e 5 µg/ml de Citocalasina D diluída em solução salina de Howard Ringer.

Para padronizar o volume de fármaco aplicado em cada embrião, nitrocelulose foi recortada com perfurador de papel, produzindo círculos de 6 mm de diâmetro, os quais foram recortados em semi-círculos e novamente ao meio. A nitrocelulose a ser utilizada nos embriões foi deixada de molho na solução contendo o fármaco por cerca de 10 horas a 4 °C para adsorção da droga.

2.7.2 Tratamento in ovo com Citocalasina D

Ovos fertilizados foram incubados para que chegassem ao estágio de placóide do cristalino (18 a 21 somitos). Após a incubação, os embriões foram expostos *in ovo*, conforme descrição a seguir. Os ovos foram colocados de lado em um suporte e com auxílio de uma seringa, 2 ml de albumina foi retirada pelo lado mais agudo do ovo. Com tesoura fina, uma pequena abertura foi feita na parte superior da casca do ovo para se ter acesso ao embrião. Com uma seringa de insulina em forma de gancho, nanquim estéril a 10% (diluído em solução salina de Howard Ringer) foi injetado no vitelo, logo abaixo do embrião para produzir um anteparo escuro que permitisse a visualização do embrião e o seu correto estagiamento.

Nitrocelulose embebida em Citocalasina D (vide seção 2.7.1) foi aplicada sobre a região cranial do embrião, cobrindo completamente o olho direito.

Os ovos tratados foram selados com fita adesiva e re-incubados por 6 a 12 horas, até que os embriões chegassem ao estágio com 22 somitos, quando, em embriões controle, o cristalino já iniciara o processo de invaginação. Os embriões foram coletados com papel-filtro (vide seção 2.3), processados para corte em parafina e corados com Hematoxilina-Eosina (vide seção 2.5) para analisar a invaginação do placóide do cristalino.

2.7.3 Reversibilidade do tratamento in ovo com Citocalasina D

Citocalasina D possui ação reversível, sendo possível permitir a repolimerização de actina nas células desde que o fármaco seja removido do meio. Para excluir a possibilidade de uma ação citotóxica de Citocalasina D ser a responsável pelo impedimento da invaginação dos cristalinos, embriões previamente incubados com o fármaco e que tiveram a invaginação do cristalino inibida após

atingirem o estágio de 22 somitos (vide seção 2.7.2) foram novamente expostos *in ovo*, tiveram a nitrocelulose que contém Citocalasina D removida e receberam a aplicação de 1 ml de solução salina de Howard Ringer para diluir Citocalasina D. Os ovos foram selados e re-incubados por cerca de 12 horas para avaliar se o cristalino continuaria seu desenvolvimento, o que indicaria que Citocalasina D não estaria inibindo a invaginação do cristalino por causar morte celular generalizada no tecido. A morfologia do cristalino foi analisada em cortes de parafina corados com Hematoxilina-Eosina (vide seção 2.5).

2.8 Eletroporação

2.8.1 Elaboração do plasmídeo pCL-GFPa RhoA-DN

A seqüência codificante para a proteína RhoA dominante-negativo (RhoA DN) foi gentilmente doado por Dr Fábio Forti (Laboratório de Pesquisa de Fatores de Crescimento, Hormônios e Ciclo Celular, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – Forti e Armelin, 2007). RhoA DN possui uma substituição no aminoácido 19 de Treonina para Asparagina, fazendo com que a proteína mutante tenha maior afinidade por GDP do que por GTP, permanecendo, portanto, no estado inativo. Como esta proteína possui a mesma afinidade que RhoA selvagem pelos ativadores, RhoA DN inibe a sinalização de RhoA endógeno ao competir pelos ativadores.

O plasmídeo pCM contendo o gene RhoA DN foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Fermentas), e o produto da digestão foi corrido em gel de agarose ultra pura a 1% (Invitrogen) contendo Brometo de Etídeo (Sigma) a 0,6 µg/ml para a separação dos fragmentos. O gel de agarose foi cortado sob luz ultra-violeta na altura da banda de 1 kb, que continha o fragmento RhoA DN, e a seqüência de interesse foi purificada do gel utilizando o kit de purificação da Qiagen (QIAquick Gel extraction kit).

O plasmídeo pCL-GFPa (doação de Dr Christophe Marcelle do Laboratório de Genética e de Fisiologia do Desenvolvimento, Instituto de Biologia do Desenvolvimento de Marselha, Universidade de Aix-Marseille) é um promotor bicistrônico, onde o promotor beta-actina de galinha e o “*enhancer*” de citomegalovirus (CMV) dirigem a expressão da seqüência de interesse subclonada no sítio múltiplo de clonagem (MCS), enquanto que o promotor constitutivo SV 40

dirige a expressão de eGFP. O plasmídeo pCL-GFPa foi digerido com a enzima de restrição EcoRI, linearizando o plasmídeo no MCS, e ligado com a sequência RhoA DN previamente digerida com EcoRI para gerar o plasmídeo pCL-GFPa RhoA DN (Fig. 10E). A sequência subclonada no pCL-GFPa foi verificada por seqüenciamento, utilizando os “*primers Forward*” GTT GTG CTG TCT CAT CAT TTT GGC AAA ou “*Reverse*” AAG GCA CAG TCG AGG CTG ATC AGC GG, que se hibridam com o plasmídeo pCL-GFPa, flanqueando o sítio MCS.

2.8.2 Eletroporação

Ovos fertilizados foram incubados até atingirem o estágio com cerca de 10 somitos, estágio em que o placóide do cristalino ainda não se espessou. Para realizar a eletroporação, os embriões foram expostos *in ovo* e contrastados com solução de nanquim (vide seção 2.7.2). Após realizado o contraste, eletrodos formados por 2 fios de platina com 0,125 mm² de espessura e separados por 4 cm de distância foram posicionados na altura das vesículas ópticas, flanqueando o embrião. Como o plasmídeo migra em direção ao pólo positivo, este foi posicionado ao lado do olho esquerdo do embrião, enquanto que o pólo negativo ao lado do olho direito, fazendo com que o cristalino direito fosse eletroporado (Fig. 10).

Com uma agulha de tungstênio, a membrana vitelínica que recobre o embrião foi removida na altura do olho direito e 1 ml de solução salina de Howard Ringer foi aplicada sobre o olho para remover a albumina presente entre os eletrodos, permitindo a melhor condução elétrica (Momose et. al., 1999). Capilares de vidro de 1 mm de diâmetro interno (Perfecta) estirados em esticador de capilares de vidro (P-97 micropipette puller da Sutter Instrument Company) foram utilizados para aplicar os plasmídeos sobre o ectoderme pré-cristalino dos embriões.

Os plasmídeos pCL-GFPa ou pCL-GFPa RhoA-DN foram diluídos em água ultra pura na concentração de 4 µg/µl e tingidos com “Fast Green” (Sigma) para visualizar a aplicação no embrião. Com o capilar de vidro estirado, solução de plasmídeo foi injetado no espaço subcefálico, próximo ao ectoderme pré-cristalino direito, até que o ectoderme ficasse completamente banhado pela solução. Sem retirar o capilar de vidro de perto do embrião, 5 pulsos elétricos de 20 volts com duração de 50 ms e 100 ms de intervalo entre os pulsos foram gerados por um

eletroporador (TSS20 *Ovodyne electroporator*, acoplado ao amplificador de corrente EP21, ambos da IntraCel) em torno da região cranial do embrião.

Figura 10 – Descrição do método de eletroporação. Ovos incubados por 36 horas, para se obter embriões no estágio HH10, são abertos lateralmente (A,B). Solução de nanquim a 10% é injetado no vitelo, servindo como anteparo para visualização do embrião (C). Eletrodos conectados ao eletroporador são colocados flanqueando a porção cranial do embrião, de modo que o pólo positivo seja colocado ao lado do olho esquerdo e o pólo negativo ao lado do olho direito. Com microcapilar de vidro injeta-se solução contendo o plasmídeo a ser eletroporado próximo ao olho direito do embrião. Com a aplicação dos pulsos elétricos, o plasmídeo migra para o pólo positivo, penetrando as células do ectoderme pré-cristalino (D). Após 24 horas, os ovos são abertos e analisados quanto à presença de GFP, indicativo da eficácia da super-expressão. Detalhe do plasmídeo eletroporado: pCL-GFPa contendo o gene RhoA-DN. Modificado de Momose et al., 1999.

O ovo foi selado com fita adesiva e re-incubado por cerca de 24 horas, tempo suficiente para os embriões atingirem o estágio de no mínimo 22 somitos. Após esse período, os embriões foram analisados em microscópio estereoscópio de fluorescência (Nikon SMZ 1500) para avaliar a presença de GFP nos cristalinos, o que indica a eficácia da eletroporação.

Os embriões GFP positivos foram processados para serem cortados em criostato e realizou-se imuno-histoquímica para miosina II e miosina II fosforilada para avaliar, respectivamente, a localização e a ativação de miosina II nas porções apicais dos cristalinos. Como a eletroporação não ocorre de modo homogêneo por todo o cristalino, nos cortes histológicos há regiões onde é possível observar a

presença de GFP e regiões onde este está ausente. Esta heterogeneidade de GFP nos cortes de cristalinos serviu para comparar o padrão de expressão de miosina II e de miosina II fosforilada em regiões GFP positivas, onde se supõe haver expressão de RhoA DN, com regiões controle sem a expressão de GFP, e sem RhoA DN.

3 RESULTADOS

3.1 Actina filamentosa colocaliza com miosina II na porção apical do cristalino antes de a invaginação iniciar e se mantém na porção apical durante todo o processo de invaginação

A constrição celular apical exerce a força necessária para a invaginação de diversos epitélios (Kinoshita et al., 2008; Lee e Harland, 2007; Sai e Ladher, 2008; van Straaten et al., 2002; Sweeton et al., 1991; Young et al., 1991). Nestes modelos, a invaginação é precedida pela localização de actina filamentosa e de miosina II na porção apical do tecido, local onde deve ocorrer a contração dos filamentos de actina e a conseqüente diminuição do perímetro celular. Além disto, quando actina ou miosina II são impedidos de localizar na porção apical do mesoderme nestes modelos, a invaginação não ocorre, deixando claro que a polarização do citoesqueleto de actina-miosina II é necessária para o processo de invaginação (Dawes-Hoang et al., 2006; Kinoshita et al, 2008; Lee e Harland, 2007; Sai e Ladher, 2008). Em conjunto, estes dados sugerem que a localização de elementos contráteis na porção apical das células anteriormente à invaginação são a causa da invaginação do mesoderme e não uma conseqüência deste processo.

Para verificar se a constrição celular apical poderia contribuir também para a invaginação do placóide do cristalino, analisamos o padrão de expressão das proteínas actina filamentosa e miosina II em cortes histológicos de cristalino em três momentos do desenvolvimento – (1) antes de a invaginação se iniciar e antes do placóide ser definido (epitélio cúbico do ectoderme pré-cristalino), (2) antes da invaginação, mas posterior à indução do placóide (epitélio paliçádico do placóide do cristalino) e (3) durante a invaginação do cristalino - para verificar se estas proteínas estariam presentes na porção apical do cristalino antes de a invaginação ser iniciada.

No estágio de ectoderme pré-cristalino, tanto actina filamentosa quanto miosina II estão distribuídas de modo homogêneo por todo o contorno celular, ocorrendo nas porções basal, apical e laterais das células (Fig. 11A-C). Após o alongamento das células do ectoderme pré-cristalino para formar o placóide do cristalino, a expressão nas porções basal e laterais diminuem, e actina filamentosa e miosina II podem ser observadas exclusivamente na região apical do placóide do

cristalino (Fig. 11D-F). Neste estágio, podemos observar que actina filamentosa forma um anel em torno da porção apical das células (Fig. 11D'-F' – setas). Estes anéis têm sido descritos como importantes na constrição celular apical, pois se associam a miosina II (veja que em algumas células também é possível observar miosina II formando anéis colocalizando com actina filamentosa – fig. 11E' - seta) e a elementos de adesão célula-célula (como as Junções Aderentes – veja abaixo), causando a contração das células e a redução do perímetro apical do tecido durante a constrição celular apical (Dawes-Hoang et al., 2005; Hildebrand, 2005; Nishimura e Takeichi, 2003; Vaezi et al., 2002). Quando o cristalino inicia o processo de invaginação, a maior expressão de actina filamentosa e de miosina II se mantém na porção apical do cristalino, ficando restrita à fosseta de invaginação (Fig. 11G-I). A localização tanto de actina filamentosa quanto de miosina II se mantém restrita na porção apical do cristalino durante todo o processo de invaginação.

Neste trabalho utilizamos dois anticorpos diferentes para detectar miosina II. Um deles reconhece uma porção conservada da cadeia pesada de miosina II, sequência idêntica a todas as três isoformas de miosina II (miosina IIA, IIB e IIC), marcando, portanto, miosina II total (Espreafico et al., 1992), conforme descrito acima. O segundo anticorpo utilizado reconhece exclusivamente miosina IIB.

Miosina IIB também está presente em maior concentração na porção apical do placóide do cristalino (Fig. 12A-C e detalhes em A'-C'). Com o início da invaginação, miosina IIB continua sendo expressa em maior concentração na porção apical do cristalino, de forma restrita à fosseta de invaginação (Fig. 12D-F).

A colocalização das proteínas contráteis actina filamentosa e miosina II na porção apical do cristalino antes de a invaginação se iniciar, ou seja, no estágio de placóide do cristalino, sugere que a constrição celular apical movida pelo citoesqueleto de actina e miosina poderia contribuir para a invaginação do cristalino.

Figura 11 – Actina filamentosa e miosina II são expressas na porção apical do cristalino antes de iniciar a invaginação (no estágio de placóide do cristalino). Histoquímica com faloidina para marcação de actina filamentosa e imuno-histoquímica para miosina II total em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: A-C ectoderme pré-cristalino (HH 16); D-F placóide do cristalino (HH 19 – 20); G-I cristalino invaginando (HH 22); J-L ectoderme peri-cristalino. Porção apical está voltada para a direita, basal para a esquerda. Pontilhado indica o limite basal do cristalino. No estágio de ectoderme pré-cristalino, actina filamentosa e miosina II estão presentes nas porções baso-laterais das células (A-C). No estágio de placóide do cristalino, actina filamentosa e miosina II estão presentes exclusivamente na porção apical, formando anéis (D-F; detalhes dos anéis apicais em D'-F' - setas). Com o início da invaginação, actina filamentosa e miosina II continuam presentes na porção apical do cristalino (G-I). Actina filamentosa e miosina II não estão presentes na porção apical do ectoderme peri-cristalino (J-L). Barra 20 μ m.

Figura 12 – Miosina IIB é expressa na porção apical do placóide do cristalino e durante a invaginação. Histoquímica com faloidina para marcação de actina filamentosa e imunohistoquímica para miosina IIB em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: A-C placóide do cristalino (HH 19 – 20) e D-F cristalino invaginando (HH 22). Porção apical está voltada para a direita, basal para a esquerda. Pontilhado indica o limite basal do cristalino. Miosina IIB está presente na porção apical do placóide do cristalino (A-C; aumento em A'-C') e continua presente na porção apical do cristalino invaginando (D-F). Barra 20 μ m.

3.2 A localização apical de actina filamentosa e de miosina II é característica específica do cristalino, não ocorrendo no restante do ectoderme

Para demonstrar que a presença de actina filamentosa e de miosina II na porção apical do placóide do cristalino é um evento específico nos tecidos que irão invaginar, e não um evento que ocorre em todos os epitélios cefálicos nesta etapa da embriogênese, analisamos a presença dos elementos contráteis no ectoderme peri-cristalino, tecido contínuo ao cristalino que não passa pelo processo de invaginação.

No ectoderme peri-cristalino, tanto actina filamentosa quanto miosina II estão presentes de modo homogêneo nas porções basal e laterais das células, e não ocorrem na porção apical (Fig. 11J-L). O mesmo padrão de expressão de actina filamentosa e de miosina II encontrado no ectoderme peri-cristalino foi observado no ectoderme pré-cristalino (Fig. 11A-C). Este estágio é anterior à formação do placóide do cristalino e, portanto, também pode ser considerado como um tecido que não está apto para o processo de invaginação. Note que nestes tecidos (ectoderme peri-cristalino e no cristalino anteriormente à formação do placóide), não há a presença de actina filamentosa na porção apical, somente actina cortical nas porções basal e laterais das células (Mège et al., 2006).

Com estes resultados, concluímos que a localização apical de actina filamentosa e de miosina II ocorre de modo específico no cristalino em processo de invaginação, reforçando a hipótese da participação da constrição celular apical na invaginação do cristalino.

3.3 Miosina Va não é expressa na porção apical do cristalino durante a invaginação

A presença acumulada de actina e miosina II na região apical durante a morfogênese do cristalino também poderia ser causada por aumento de atividade de transporte vesicular na região apical (DePina et al., 2007). Para demonstrar que a imuno-marcação apical de actina filamentosa e de miosina II durante a morfogênese do cristalino é um evento específico para estas proteínas exercerem seu papel contrátil na morfogênese, realizamos imuno-histoquímica para miosina Va em cortes histológicos de cristalino durante a morfogênese.

Miosina Va é uma proteína motora que também possui afinidade por actina filamentosa e está envolvida com o transporte intracelular de vesículas e RNAm (Mermall et al., 1998; Sellers e Veigel, 2006), não estando diretamente relacionada com a mudança de formato celular.

No ectoderme pré-cristalino, a expressão de miosina Va ocorre nas porções basal, laterais e apical das células. Diferentemente de miosina II, miosina Va está presente homogeneamente pelo citoplasma e não restrita ao córtex ou à porção apical das células, e é possível observar a presença de miosina Va em locais que não colocalizam com actina filamentosa (Fig. 13A-C). No estágio de placóide do cristalino (Fig. 13D-F) e no cristalino invaginando (Fig. 13G-I), miosina Va continua presente de modo homogêneo por todo o cristalino, desde sua porção basal até a porção apical do tecido. Novamente, a expressão de miosina Va pode ser observada no citoplasma, onde não ocorre colocalização com actina filamentosa. No estágio de placóide do cristalino, diferentemente de miosina II, miosina Va não forma anéis na porção apical do tecido (compare Fig. 11E' com Fig. 13E'), sugerindo que miosina Va não participaria da constrição celular apical.

A presença de miosina Va de modo irrestrito por todo o cristalino e a ausência de colocalização com actina filamentosa na porção apical do cristalino invaginando exclui a possibilidade de miosina Va participar da constrição celular apical e reforça a nossa hipótese de que a localização apical de miosina II é um evento específico que pode ter papel importante na invaginação do placóide do cristalino.

3.4 A miosina II localizada na porção apical do cristalino invaginando está na forma ativada

Para que a constrição celular apical participe da invaginação do placóide do cristalino, miosina II deve ser capaz de contrair a porção apical das células que compõem o placóide, causando a redução do perímetro apical do tecido e conseqüentemente causando a invaginação. Como a atividade contrátil de miosina II requer que esta seja fosforilada na cadeia leve regulatória para ser funcional, verificamos se a miosina II presente na porção apical durante o desenvolvimento do cristalino está na forma fosforilada. Para isso, realizamos imuno-histoquímica com o anticorpo anti-cadeia leve fosforilada na Serina 19 da cadeia leve de 20 kDa de miosina II, em cortes histológicos durante o desenvolvimento do cristalino.

No estágio de ectoderme pré-cristalino miosina II fosforilada está presente em todo o contorno celular, ocorrendo na porção baso-lateral e apical das células (Fig. 14A-C). Diferentemente de miosina II, miosina II fosforilada não está presente na porção apical do placóide do cristalino. Neste estágio, miosina II fosforilada continua presente nas porções basal, laterais e apical das células (Fig. 14D-F). Note que actina filamentosa já se encontra em maior concentração na porção apical do placóide do cristalino, indicando que a ausência de miosina II fosforilada neste tecido não é devido à utilização de um placóide menos desenvolvido quando comparado com o utilizado para a descrição de miosina II. Miosina II fosforilada somente pôde ser observada na porção apical do cristalino quando a invaginação já se iniciou (Fig. 14G-I).

Estes dados sugerem que miosina II localizada na porção apical do cristalino se encontra ativado no processo de invaginação e, reforça a hipótese da contribuição da constrição celular apical durante a invaginação do cristalino.

Figura 13 – Miosina Va não está restrita à porção apical do cristalino durante a invaginação.

Histoquímica com faloidina para visualização de actina filamentosa e imuno-histoquímica para miosina Va em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: A-C ectoderme pré-cristalino (HH 16); D-F placóide do cristalino (HH 19 – 20); G-I cristalino invaginando (HH 22); J-L ectoderme peri-cristalino. Porção apical está voltada para a direita, basal para a esquerda. Pontilhado indica o limite basal do cristalino. Em nenhum estágio analisado, miosina Va se encontra restrita à porção apical do cristalino. Note que a expressão de miosina Va ocorre de modo homogêneo por todo o citoplasma, e não de modo restrito ao córtex celular, evidenciado pela marcação para actina filamentosa (D). Miosina Va não forma anéis na porção apical do cristalino (detalhes em D'-F') como miosina II, indicando que miosina Va não estaria relacionada com a invaginação do cristalino. Barra 20 μ m.

Figura 14 – Miosina II presente na porção apical do cristalino está na forma contrátil durante a invaginação. Histoquímica com faloidina para visualização de actina filamentosa e imuno-histoquímica para miosina II fosforilada em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: A-C ectoderme pré-cristalino (HH 16); D-F placóide do cristalino (HH 19 – 20); G-I cristalino invaginando (HH 22). Porção apical está voltada para a direita, basal para a esquerda. Pontilhado indica o limite basal do cristalino. Miosina II fosforilada está presente nas porções baso-laterais das células nos estágios de ectoderme pré-cristalino (A-C) e de placóide do cristalino (neste estágio, actina filamentosa já está presente na porção apical - D-F). Somente com o início da invaginação miosina II fosforilada pode ser observada na porção apical do cristalino (G-I). Barra 20 μ m.

3.5 Actina filamentosa é necessária para a invaginação do placóide do cristalino

Para verificar se a actina filamentosa localizada na porção apical do cristalino é necessária para a invaginação do placóide do cristalino, embriões com o cristalino em estágio de placóide (embriões com 18 a 21 somitos) foram tratados *in ovo* com o fármaco Citocalasina D, inibidor da polimerização de actina. Os embriões foram incubados com o fármaco por 6 a 12 horas, tempo suficiente para que se desenvolvessem até o estágio com 22 somitos, estágio em que o processo de invaginação se inicia em embriões controles.

Com o tratamento de 1,5 µg/ml de Citocalasina D, 35% (n=20) dos embriões apresentaram os cristalinos arrestados no estágio de placóide (Fig. 15D). Aumentando-se a concentração do fármaco para 2,5 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente 56% (n=14) e 69% (n=16) dos embriões apresentaram cristalinos arrestados em estágio de placóide (Fig. 15H), enquanto que 100% dos embriões controles apresentaram os cristalinos invaginando (n=4 e n=20 para controles com solução salina ou DMSO, respectivamente) (Fig. 15B,C).

Apesar de uma proporção de embriões tratados com Citocalasina D terem apresentado cristalinos invaginando (65%, 44% e 31% dos embriões tratados com 1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente), foi possível observar que em alguns casos os cristalinos não invaginaram de maneira normal e formaram vesículas com a morfologia alterada (dados não mostrados). A quantificação dos cristalinos invaginando de maneira anormal não foi feita porque não foi possível realizar análises morfométricas dos cristalinos e estabelecer os parâmetros para considerar os cristalinos como mal-formados. A observação dos casos mais drásticos de mal-formação mencionados acima sugere que a importância da actina filamentosa para a invaginação do placóide do cristalino pode estar sendo sub-estimada neste trabalho, pois computamos a invaginação do cristalino de maneira binária (cristalino invaginando ou não), sendo que os mal-formados foram considerados como cristalinos invaginando. Nenhuma outra análise como contagem de morte ou proliferação celular e integridade tecidual foi realizada nestes cristalinos mal-formados.

A inibição da invaginação do placóide do cristalino em embriões tratados com Citocalasina D poderia ter sido causada pela toxicidade do fármaco, em outras palavras, ao inibir a polimerização do citoesqueleto de actina, as células do cristalino

poderiam entrar em apoptose e como consequência, o cristalino ficaria impedido de invaginar devido ao aumento de morte celular. Para excluir essa possibilidade, embriões tratados com 2,5 µg/ml de Citocalasina D que apresentaram inibição da invaginação do cristalino após atingirem o estágio com 22 somitos foram lavados com solução salina para diluição do fármaco e re-incubados por cerca de 24 horas para avaliar o posterior desenvolvimento do cristalino. Após a re-incubação, 100% (n=7) dos embriões apresentaram cristalinos invaginando normalmente, inclusive chegando ao estágio de vesícula do cristalino, quando este se fecha na porção mais distal e se destaca do ectoderme circundante (Fig. 15G). Este dado sugere, portanto, que o tratamento com Citocalasina D não impediu a invaginação do placóide do cristalino por causar aumento de morte celular. Outra evidência de que Citocalasina D não provocou morte celular no placóide do cristalino impedido de invaginar é a ausência de núcleos picnóticos nos cortes histológicos de cristalinos tratados com Citocalasina D. Contudo, o tratamento causou pronunciada morte celular no neuroepitélio, tecido subjacente ao placóide do cristalino (Fig. 15D' – setas). Com este resultado, excluimos a possibilidade de Citocalasina D ter inibido a invaginação do placóide por aumentar morte celular no placóide.

O citoesqueleto de actina é um componente importante para a adesão celular. Actina filamentosa se liga de modo indireto às proteínas de adesão célula-célula conhecidas como caderinas, estabilizando o complexo adesivo e reforçando a adesão celular. Com a inibição da polimerização do citoesqueleto de actina, as Junções Aderentes poderiam ter sido enfraquecidas e as células perdido adesão e como consequência, a invaginação do placóide poderia ter sido impedida devido à dissociação tecidual. Esta possibilidade pode ser descartada, pois em cristalinos que foram impedidos de invaginar após a utilização de 2,5 µg/ml de Citocalasina D, não observamos células dissociadas provenientes do cristalino (Fig. 15D'). Note que esta concentração foi suficiente para provocar a dissociação parcial do neuroepitélio ocular (Fig. 15D' – cabeça de seta).

Figura 15 – Inibição da polimerização de actina inibe a invaginação do placóide do cristalino.

(A) Corte em parafina de cristalino de embrião com 18 somitos, corado com Hematoxilina-Eosina mostrando que neste estágio, o placóide do cristalino já está espessado. Note que a porção central do tecido é mais espessa que o ectoderme circundante. (B-D) Embriões em estágio de placóide do cristalino tratados com CD (D), solução salina (B) ou DMSO (C), os dois últimos tratamentos utilizados como controle experimental. Embriões tratados *in ovo* foram re-incubados por 6 horas e processados para corte em parafina e coloração com HE. 56% dos embriões tratados com 2,5 µg/ml CD tiveram a invaginação do cristalino inibida, permanecendo no estágio de placóide do cristalino (D) (n=14), enquanto que 100% dos embriões tratados com solução salina (n=4) ou DMSO (n=20) apresentaram o cristalino invaginando (B,C). Embriões previamente tratados com 2,5 µg/ml CD por 6 horas foram novamente expostos *in ovo*, tiveram a CD diluída com aplicação de solução salina e foram re-incubados por 12 horas para analisar a reversibilidade do tratamento com CD. Após diluição de CD, 100% dos embriões apresentaram o cristalino invaginando (G; n=7), de modo semelhante aos controles re-incubados (E, F). (H) O aumento da concentração de CD causou o aumento da proporção de embriões com a invaginação do cristalino inibida 35% (n=20), 56% (n=14) e 69% (n=16) para 1,5, 2,5 e 5 µg/ml de CD, respectivamente. (A'-D') Aumentos respectivos de A-D, mostrando que não há presença de núcleos picnóticos no cristalino, nem células dissociadas do cristalino nos embriões tratados com CD (D'), ou nos controles (A'-C'), indicando que a inibição da invaginação do placóide do cristalino não ocorreu devido ao aumento de morte celular ou por causa da dissociação tecidual. Note que o tratamento com CD causou intensa morte celular no neuroepitélio, indicada pela presença de núcleos picnóticos (D' setas) e alguma dissociação tecidual (D' – cabeça de seta). Barra (A-G) 20 µm e (A'-D') 10 µm.

Figura 15 – Inibição da polimerização de actina inibe a invaginação do placóide do cristalino.

3.6 A GTPase RhoA é expressa na porção apical do cristalino durante a invaginação

A invaginação epitelial apresenta características conservadas em diversos modelos animais, como a localização dos filamentos contráteis de actina e miosina na porção apical do epitélio, evento que ocorre anteriormente ao início da invaginação. A GTPase RhoA tem sido descrita como suficiente e necessária para este processo morfogénico em diversos modelos animais (Barret et al., 1997; Beane et al., 2006; Dawes-Hoang et al., 2005). Além disso, a sinalização via RhoA têm papel fundamental em diversos processos de re-arranjo do citoesqueleto, como por exemplo, é necessária para a localização de miosina II nos ápices celulares antes de a invaginação iniciar, para a ativação da atividade contrátil de miosina II (fosforilação da cadeia leve regulatória) e como auxiliador para o início da polimerização de actina (Burridge e Wennerberg, 2004; Conti e Adelstein, 2008; Winder e Ayscough, 2005).

Dado o papel central de RhoA tanto na invaginação de epitélios em outros modelos quanto na regulação do citoesqueleto, verificamos se RhoA também poderia regular a invaginação do placóide do cristalino. Para tanto, iniciamos esta verificação descrevendo o padrão de expressão de RhoA através de imunohistoquímica em cortes histológicos de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino. No ectoderme pré-cristalino, RhoA está presente nos contornos celulares, igualmente presente nas porções baso-laterais e apical (Fig. 16A). Com a formação do placóide do cristalino, RhoA pode ser observado com maior intensidade na porção apical (Fig. 16B). Quando o cristalino inicia a invaginação, a expressão de RhoA fica quase que restrita à porção apical da fosseta de invaginação (Fig. 16C).

A localização de RhoA durante o desenvolvimento do cristalino é semelhante à localização de actina filamentosa e de miosina II: na porção apical do placóide do cristalino e do cristalino invaginando (compare figuras 11D,E,G,H com 16B,C). Dada a importância de RhoA para a regulação do citoesqueleto, a localização de RhoA sugere que esta molécula pode desempenhar algum papel na invaginação do cristalino.

Figura 16 – A GTPase RhoA é expressa durante a morfogênese do cristalino. Imuno-histoquímica para RhoA em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: (A) ectoderme pré-cristalino (HH 16); (B) placóide do cristalino (HH 19 – 20); (C) cristalino invaginando (HH 22). Porção apical do cristalino está para a direita e basal para a esquerda. Linha pontilhada indica limite basal do cristalino. Dorsal está voltado para cima. RhoA é expressa nas laterais das células do ectoderme pré-cristalino, não havendo diferenças na intensidade de imuno-marcação pelo tecido. No estágio de placóide do cristalino, RhoA se encontra enriquecida na porção apical do cristalino. Com o início da invaginação, a maior expressão de RhoA continua sendo encontrada na porção apical do cristalino, estando restrita à fosseta de invaginação. Barra 20 μ m.

3.7 Inibição de RhoA não impede a invaginação do placóide do cristalino, não impede a localização apical de miosina II e nem altera seu estado de fosforilação

Para analisar a importância de RhoA para a invaginação do cristalino, analisamos se esta GTPase poderia estar envolvida no processo de translocação de miosina II para a porção apical do placóide do cristalino, local onde segundo nossa hipótese, deve haver a contração do citoesqueleto de actina para que a invaginação do cristalino se inicie. Além disso, como miosina II ativada está presente na porção apical de cristalinos invaginando, perguntamos se RhoA poderia ser a responsável pela fosforilação da cadeia leve regulatória de miosina para ativar a ação contrátil de miosina II presente na porção apical do cristalino.

Para verificar se RhoA participa da invaginação do placóide do cristalino, e de que modo poderia estar envolvida neste processo (na translocação ou na ativação de miosina II), a atividade de RhoA endógeno foi inibida através da super-expressão,

por eletroporação, da forma constitutivamente inativada de RhoA (RhoA-DN). Embriões foram eletroporados em estágio de ectoderme pré-cristalino para que fosse possível obter a expressão de RhoA-DN antes que o placóide se formasse, e portanto, antes que miosina II se localizasse na porção apical. O plasmídeo contendo o gene RhoA-DN também contém o gene para GFP sob um segundo promotor constitutivo, funcionando como repórter da expressão de RhoA-DN nas células eletroporadas (Fig. 10E). Após a eletroporação, os embriões se desenvolveram até o estágio mínimo de 22 somitos, quando foi verificada a ocorrência da invaginação do cristalino e a presença e a fosforilação de miosina II na porção apical do cristalino.

Figura 17 – A GTPase RhoA não é necessária para a invaginação do placóide do cristalino.

Cristalinos eletroporados com o plasmídeo controle (pCL-GFPa) (A,B) ou com o plasmídeo pCL-GFPa contendo a forma dominante-negativo de RhoA (pCL-GFPa RhoA-DN) (C,D) em vista frontal. (B e D) Visão da expressão de GFP proveniente da eletroporação. Tanto cristalinos eletroporados com o plasmídeo controle (n=2) (A,B) quanto os cristalino eletroporados com RhoA-DN (n=2) (C,D), apresentaram cristalinos invaginando. O pontilhado interno delimita o poro do cristalino, ou seja, o quanto falta para os lábios do cristalino se fundirem para formar a vesícula do cristalino (veja representação do poro do cristalino em visão lateral em E). O pontilhado externo é o limite entre o cristalino e o neuroepitélio ocular. (E) Diagrama mostrando o cristalino invaginando em vista lateral. Seta vermelha no sistema de eixos indica o eixo próximo-distal em ambos os casos.

Tanto embriões eletroporados com plasmídeo controle (Fig. 17A,B) (n=2) quanto com plasmídeo contendo o gene RhoA-DN (Fig. 17C,D) (n=2) apresentaram os cristalinos invaginando em 100% dos casos. Para a análise da invaginação do cristalino somente foram contabilizados os embriões que apresentaram a expressão de GFP em uma área bastante extensa do cristalino, e que conseqüentemente

apresentariam RhoA inibido por todo o cristalino e não em apenas um grupo de células. Como a invaginação do cristalino ocorreu mesmo com a expressão bastante ampla de RhoA-DN, concluímos que RhoA não é necessário para a invaginação do cristalino.

Nos cortes histológicos de outra série de cristalinos eletroporados podemos observar regiões com presença e ausência de GFP (Fig. 18A,C). Locais onde não é possível observar GFP, as células não incorporaram o plasmídeo e, portanto, não expressam RhoA-DN, enquanto que porções do tecido que apresentam GFP, o plasmídeo foi incorporado e por isso deve haver expressão de RhoA-DN. Imuno-histoquímica para miosina II ou miosina II fosforilada foi realizada nos cristalinos eletroporados para verificar a presença de miosina II e miosina II fosforilada na porção apical do cristalino, sendo que as porções do cristalino onde não ocorre inibição de RhoA (GFP negativo) serviram de controle para comparar a expressão de miosina II ou de miosina II fosforilada em locais onde RhoA estaria sendo inibido (GFP positivo).

Em embriões eletroporados com o plasmídeo controle tanto miosina II quanto miosina II fosforilada estão presentes na porção apical do cristalino invaginando, não apresentando diferenças na intensidade de marcação em locais GFP positivo e em locais GFP negativo, demonstrando que a eletroporação não altera o padrão de distribuição destas proteínas na porção apical do cristalino (dados não mostrados). Em embriões eletroporados com pCL-GFPa RhoA-DN, novamente nenhuma alteração no padrão de expressão de miosina II (Fig. 18A-C) ou de miosina II fosforilada (Fig. 18D-F) foi observada quando comparamos regiões GFP positivas (Fig. 18C',F' – seta) com GFP negativas (Fig. 18C',F' – cabeça de seta). Nestes casos, tanto miosina II quanto miosina II fosforilada continuam sendo expressas na porção apical do cristalino invaginando.

Estes dados sugerem que apesar de RhoA ser suficiente e necessário para a invaginação epitelial em diversos modelos, RhoA não é necessária para a invaginação do cristalino, e também não é necessária para a localização apical de miosina II ou para a fosforilação desta miosina II presente na porção apical durante a invaginação do cristalino.

Figura 18 – A GTPase RhoA não é necessária para a localização apical de miosina II nem para sua fosforilação. Cristalinis eletroporados com o plasmídeo pCL-GFPa RhoA-DN foram cortados em criostato e tratados para imuno-histoquímica para miosina II (A-C) ou miosina II fosforilada (D-F). Nestes casos, a eletroporação não ocorreu de maneira homogênea por todo o cristalino, havendo locais onde GFP está sendo expresso (C,F - setas) e locais onde GFP não está sendo expresso (C,F – cabeça de setas). Locais onde não há GFP, e portanto RhoA-DN não estaria sendo expresso, serve de controle para a imuno-marcação para miosina II ou miosina II fosforilada em locais onde há GFP e acredita-se haver a super-expressão de RhoA-DN. Miosina II está presente na porção apical do cristalino mesmo em locais GFP positivos (C,C' – seta), de maneira semelhante a locais onde não há GFP (C,C' – cabeça de seta). O mesmo ocorre para miosina II fosforilada, que ocorre na porção apical do cristalino tanto em locais GFP positivos (F,F' – seta) quanto em locais GFP negativos (F,F' – cabeça de seta). Com estes resultados, concluímos que a localização apical de miosina II e sua fosforilação não dependem de RhoA. Barra 20 μ m.

3.8 As Junções Aderentes se localizam na porção apical do cristalino somente após o início da invaginação

Para que a invaginação epitelial ocorra é necessário que a adesão celular seja mantida durante a morfogênese para garantir a integridade epitelial e o sucesso da invaginação. As adesões celulares devem, também, ser moduladas para reforçar a coesão tecidual em locais onde haja aumento das forças de tensão que agem para o modelamento do tecido. Consistente com isto, foi demonstrado que cristalinos de embriões de camundongo mutantes para beta-catenina, proteína que liga as caderinas ao citoesqueleto de actina, possuem as junções celulares diminuídas, e a invaginação do cristalino deixa de ocorrer por causa da parcial desintegração tecidual (Smith et al., 2005). Além disso, se o anel de actina e miosina II localizado apicalmente estiver ancorado à membrana plasmática, mas as células adjacentes não estiverem aderidas, a contração da actina leva a uma alteração do formato celular sem, contudo, provocar a invaginação epitelial (Ivanov et al., 2004). Em *Drosophila*, as Junções Aderentes são ativamente reguladas durante a invaginação do mesoderme. Antes de a invaginação se iniciar, as Junções Aderentes estão presentes na porção subapical do mesoderme da *Drosophila*, e com o início da invaginação, as junções se dispõem na porção apical do tecido (Kolsh et al., 2007).

Como a importância das Junções Aderentes durante a invaginação do cristalino já foi descrita previamente em embriões de camundongo (Smith et al., 2005), neste trabalho caracterizamos o padrão de expressão de caderina e de beta-catenina durante o desenvolvimento do cristalino, para verificar como a distribuição das Junções Aderentes são alteradas durante a invaginação.

Consistente com a sua função de prover coesão tecidual, caderina e beta-catenina são expressas nas porções basal, laterais e apical das células que formam o ectoderme pré-cristalino (Fig. 19A-C). Com a formação do placóide do cristalino, tanto caderina quanto beta-catenina continuam sendo expressas nas porções basal, laterais e apical das células (Fig. 19D-F). Contudo, a marcação apical neste estágio é mais evidente que no estágio anterior. É possível observar neste estágio, a presença de Junções Aderentes formando anéis na porção apical do placóide, de modo semelhante ao formado por actina filamentosa e miosina II. O acúmulo de Junções Aderentes na porção apical fica mais evidente quando o cristalino inicia a invaginação. Nesta etapa, a marcação para caderina e beta-catenina apical é bem

mais intensa que nas porções baso-laterais das células. O enriquecimento de elementos da junção adesiva na região apical continua à medida que o desenvolvimento do placóide progride (Fig. 19G-I). Em contraste, no ectoderme pericristalino, tecido que não participa do processo de invaginação, caderina e beta-catenina permanecem nas porções laterais das células e não são expressas na porção apical (Fig. 19G'-I').

Figura 19 – As Junções Aderentes somente se acumulam apicalmente durante a invaginação do cristalino. Imuno-histoquímica para beta-catenina e caderina em cortes congelados de diferentes estágios de desenvolvimento do cristalino: A-C ectoderme pré-cristalino (HH 16); D-F placóide do cristalino (HH 19 – 20); G-I cristalino invaginando (HH 22); G'-I' ectoderme peri-cristalino. Porção apical está voltada para a direita, basal para a esquerda. Pontilhado indica o limite basal do cristalino. No caso do ectoderme peri-cristalino (G'-I'), apical está voltada para cima. No estágio de ectoderme pré-cristalino, beta-catenina e caderina estão presentes nas porções baso-laterais das células (A-C). Com a formação do placóide do cristalino, os elementos de adesão celular beta-catenina e caderina continuam expressos nas porções baso-laterais do cristalino (D-F). Neste estágio, porém, já é possível observar uma pequena presença de beta-catenina e caderina na porção apical, formando estruturas em anel (setas). Somente com a invaginação do placóide do cristalino, beta-catenina e caderina se concentram apicalmente. No ectoderme peri-cristalino, beta-catenina e caderina são expressas nas porções baso-laterais das células (G'-I'). Barra 20 μ m.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho analisamos se a constrição celular apical poderia estar relacionada com a invaginação do placóide do cristalino em embriões de galinha. Para isso, caracterizamos a distribuição de proteínas contráteis (actina filamentosa e miosina II) e de adesão celular (componentes das Junções Aderentes: caderina e beta-catenina) durante a morfogênese inicial do cristalino. Além disso, verificamos se a GTPase RhoA, importante regulador do citoesqueleto, teria algum papel na invaginação do placóide do cristalino.

4.1 A localização apical dos feixes contráteis de actina e de miosina II durante a invaginação do cristalino sugere que a constrição celular apical pode estar relacionada com a invaginação do cristalino

Nos diversos modelos onde a invaginação epitelial ocorre devido à constrição celular apical mediada por actina filamentosa e miosina II, os feixes contráteis estão presentes na porção apical das células que compõem o epitélio antes que sua invaginação se inicie e se mantém na porção apical durante todo o processo de invaginação (Dawes-Hoang et al., 2005; Kinoshita et al., 2008; Lee e Harland, 2007; Nikolaidou et al., 2004; Sai e Ladher, 2008; Young et al., 1991). A presença destas proteínas na porção apical do tecido anteriormente à invaginação sugere que os elementos contráteis são a causa da invaginação e não um conseqüente acúmulo destes elementos na porção apical em decorrência da invaginação. No presente trabalho mostramos que os feixes contráteis formados por actina filamentosa e miosina II se localizam na porção apical do placóide do cristalino, estágio anterior à invaginação, sugerindo que estas proteínas podem ser a causa da invaginação do placóide do cristalino. Actina filamentosa e miosina II estão presentes contornando a porção apical das células, formando um anel contrátil.

Em diversos epitélios, o anel contrátil é interligado à membrana celular via Junções Aderentes (Dawes-Hoang et al., 2005; Hildebrand, 2005; Junghans et al., 2005; Nishimura e Takeichi, 2003; Vaezi et al., 2002), e a contração do anel faz com que o perímetro celular apical seja reduzido, alterando o formato das células que compõem o epitélio e conseqüentemente fazendo o tecido invaginar. No caso do cristalino, também observamos a presença dos complexos de adesão celular

formando um anel na porção apical do placóide do cristalino, indicando que tanto os filamentos de actina e miosina quanto os complexos caderina-catenina interagem para regular o formato celular. Outra evidência que indica que os feixes contráteis localizados na porção apical do placóide do cristalino poderiam ser a causa da invaginação do placóide do cristalino, é a ausência destas proteínas nas porções apicais do ectoderme que não passará pelo processo de invaginação, conforme demonstrado no ectoderme peri-cristalino. Consistente com esta observação, embriões de *Drosophila* também não apresentam acúmulo de miosina II na porção apical de tecidos contínuos às glândulas salivares, mesoderme ou intestino posterior, epitélios que passarão pelo processo de invaginação (Dawes-Hoang et al., 2005; Nikolaidou et al., 2004; Young et al., 1991).

4.2 Extrusões citoplasmáticas presentes na porção apical do cristalino invaginando e a diminuição da distância das junções celulares durante a invaginação sugere a participação da constrição celular apical na morfogênese do cristalino

A relação da constrição celular apical com a invaginação do cristalino coloca em contexto várias modificações morfológicas previamente descritas para a invaginação do cristalino. Uma delas é a formação de extrusões de citoplasma presentes na porção apical do cristalino invaginando (Schook, 1980A; Wrenn e Wessells, 1969). Com o início da invaginação do cristalino, a redução de volume apical das células que compõe o cristalino é acompanhada da formação de extrusões citoplasmáticas na região apical. Interessante notar que as extrusões citoplasmáticas não são encontradas no ectoderme peri-cristalino (tecido que não invagina), e que a quantidade das extrusões aumenta quando o cristalino progride na invaginação. A liberação de extrusões citoplasmáticas na porção apical também foi observada durante a invaginação epitelial em outros modelos, como durante a invaginação da placa neural em camundongos (Ybot-Gonzalez e Copp, 1999) e a invaginação do mesoderme em *Drosophila* (Sweeton et al., 1991). Do mesmo modo que não foram observadas extrusões citoplasmáticas na porção apical do ectoderme peri-cristalino (Schook, 1980A), em *Drosophila* estas extrusões também não ocorrem no blastoderme lateral, tecido adjacente ao mesoderme, que não invagina. À luz do nosso modelo, em que a constrição apical contribui para a invaginação do placóide, podemos supor que a actina filamentosa presente na porção apico-lateral das

células forma um anel, que ao se contrair, faz com que as membranas laterais sejam aproximadas, estrangulando a célula em sua porção apical. Com o estrangulamento celular, citoplasma e membrana plasmática situados apicalmente ao anel de actina formam uma bolsa, que pode ou não se destacar da célula, acomodando o excedente citoplasmático gerado pela contração celular. Finalmente, foi demonstrado que a contração do anel de actina apical mediada por miosina II leva a formação destas extrusões citoplasmáticas em cultura de células epiteliais (Ivanov et al., 2004).

4.3 Inibição da polimerização de actina impede a invaginação do cristalino

Se actina filamentosa presente na porção apical do placóide do cristalino é importante para sua invaginação, a desestruturação do citoesqueleto de actina deveria impedir a invaginação. De fato, a importância de actina filamentosa para a invaginação do cristalino em embriões de galinha foi demonstrada neste trabalho ao tratarmos embriões com Citocalasina D, fármaco que inibe a polimerização de actina. A inibição da polimerização de actina impediu a invaginação do placóide do cristalino de maneira dose dependente. O tratamento com Citocalasina D também já foi descrito como inibidor da invaginação de diversos tecidos em embriões de galinha, inibindo, por exemplo, a invaginação da placa neural (Colas e Schoenwolf, 2001; Copp, 2005; Kinoshita et al., 2008; van Straaten et al., 2002; Ybot-Gonzalez e Copp, 1999) e a invaginação do placóide ótico (Sai e Ladher, 2008). Em todos estes exemplos, acredita-se que a invaginação não ocorra porque Citocalasina D inibiu a constrição celular apical. O mecanismo de constrição celular apical ainda parece estar envolvido na invaginação de diversos outros tecidos em vertebrados, como a invaginação de outros placóides craniais, como o olfatório e a adenohipófise, a invaginação das glândulas salivares e do broto do pâncreas (Brugmann e Moody, 2005; Schlosser, 2006; Zwaan e Hendrix, 1973).

O citoesqueleto de actina desempenha diversas funções celulares, sendo importante para a manutenção e alteração do formato e da adesão celular, migração, proliferação, e transporte de vesículas e de macromoléculas. O tratamento com Citocalasina D impede que novos filamentos de actina sejam polimerizados, alterando drasticamente a fisiologia celular e podendo provocar a morte destas células. O tratamento com Citocalasina D, portanto, poderia ter provocado morte

celular generalizada no placóide do cristalino e como consequência, ter inibido a invaginação do cristalino. Esta observação pôde ser descartada, pois ao removermos o fármaco do sistema, observamos que o cristalino voltou a invaginar, em grau idêntico aos embriões controle, indicando que as células no cristalino não foram mortas pelo tratamento.

Alternativamente, o tratamento com Citocalasina D poderia ter causado morte celular no placóide e com isso tê-lo impedido de invaginar e com a remoção do fármaco, as células viáveis remanescentes no tecido poderiam proliferar e resgatar a invaginação do cristalino. Nos cortes histológicos de cristalinos tratados com Citocalasina D não foi possível observar núcleos picnóticos, indicando que as células não estavam morrendo com o tratamento (em contraste com essa observação, foi possível observar diversos núcleos picnóticos no neuroepitélio ocular, indicando que para este tecido, o tratamento foi tóxico). Estes dados sugerem, portanto, que a inibição da polimerização de actina não impediu a invaginação do cristalino devido ao aumento de morte celular no placóide.

Outra explicação para a inibição da invaginação do placóide do cristalino causada pela Citocalasina D seria a possível diminuição da proliferação celular ocorrida no placóide, uma vez que actina filamentosa é necessária para a citocinese. Além disso, foi descrito que Citocalasina D inibe a migração intercinética nuclear no tubo neural (Messier, 1978), evento relacionado com a proliferação celular em tecidos pseudoestratificados. É possível, portanto, que o tratamento com Citocalasina D tenha inibido a proliferação celular no placóide do cristalino ao impedir o movimento intercinético nuclear (Hendrix e Zwaan, 1974; Wessells et al., 1971; Zwaan et al., 1969;). Alguns autores levantaram a hipótese de que a proliferação celular dentro do placóide seria suficiente para levar à invaginação do placóide do cristalino (Hendrix et al., 1993). Este modelo propõe que o aumento do número de células no placóide aumentaria a pressão no tecido, e uma vez que o placóide está aderido em sua porção basal à matriz extra-celular, o placóide é impedido de se espalhar lateralmente. Neste caso, o único movimento possível do placóide para acomodar o crescente número de células provocado pela proliferação seria a invaginação.

Embora não tenhamos de fato quantificado a inibição da proliferação celular no placóide após tratamento com Citocalasina D, diversos artigos têm mostrado que mesmo com a redução da proliferação celular, a invaginação do placóide do

cristalino continua ocorrendo e chega a gerar uma vesícula, embora de tamanho reduzido (Dimanlig, et al., 2001; Faber et al., 2001; Wurm et al., 2008). Portanto, caso a Citocalasina D estivesse somente inibindo a proliferação celular, este efeito na inibição das mitoses não seria o suficiente para impedir a invaginação do placóide, devido ao curto período de tratamento com Citocalasina D. Em conclusão, o fenótipo obtido com a citocalasina D sugere que a actina apical participa do processo de invaginação do cristalino.

4.4 Importância de actina filamentosa na regulação das Junções Aderentes apicais e na manutenção da coesão tecidual

A adesão celular é essencial para a que a invaginação do cristalino seja completada com sucesso. Neste contexto, embriões de camundongo com ausência do gene para beta-catenina (uma das proteínas que fazem a ligação do citoesqueleto de actina ao complexo de adesão celular mediado por caderina) apresentam a invaginação comprometida devido à parcial dissociação do tecido (Smith et al., 2005). O citoesqueleto de actina é componente importante para a manutenção dos complexos de adesão celular e para reforçar a coesão tecidual. Diversos experimentos *in vitro* (Angres et al., 1996; Chu et al., 2004) e *in vivo* (Zalik et al., 1999) demonstraram que a ausência de actina filamentosa inibe a adesão celular, provocando a dissociação epitelial. As Junções Aderentes são complexos protéicos de adesão celular caracterizados pela proteína transmembrana caderina, que media a adesão celular propriamente dita, e por diversas proteínas justamembrana que se associam a caderina (como alfa e beta-cateninas) e ligam o citoesqueleto de actina ao complexo de adesão celular (Fukata e Kaibuchi, 2001; Gumbiner, 2000, 2005; Kaibuchi et al., 1999; Noritake et al., 2005; Yap e Gumbiner, 1997). Actina filamentosa ao se associar ao complexo caderina-catenina impede que este seja removido da membrana por endocitose e induz a formação de agrupamentos de caderinas nas membranas, formando estruturas em forma de zíper que reforça a adesão celular (Drees et al., 2005; Shewan et al., 2005; Yamada et al., 2005). Ao tratarmos embriões de galinha com Citocalasina D, a inibição da polimerização do citoesqueleto de actina poderia ter desestruturado as Junções Aderentes e como consequência, as células do cristalino poderiam ter perdido adesão e a invaginação do placóide poderia ter sido impedida devido à dissociação

tecidual. Esta possibilidade pôde ser descartada, pois não observamos células dissociadas do placóide do cristalino após inibição da polimerização de actina, mesmo quando a concentração utilizada foi suficiente para causar dissociação parcial do neuroepitélio ocular.

Apesar de também serem encontradas nas porções laterais das células (Mège et al., 2006), os elementos de adesão célula-célula mediado por caderinas estão concentradas na porção apical dos epitélios, formando uma estrutura semelhante ao anel de actina filamentosa e miosina II e colocalizando com estas proteínas (Abe e Takeichi, 2007; Junghans et al., 2005). Uma vez que estes anéis de actina-miosina e Junções Aderentes estão presentes em diversos epitélios em que a constrição celular apical não ocorre, como no neuroepitélio do tubo neural, a presença destas estruturas indica outra função além da constrição celular apical, como, por exemplo, participar da manutenção da adesão celular (Bao et al., 2007; Junghans et al., 2005). A presença do anel apical de actina no cristalino poderia, portanto, estar relacionada com a manutenção da coesão tecidual e não com a constrição celular apical. Contudo, deve-se ressaltar que a inibição da polimerização de actina não causou dissociação tecidual no placóide, mas impediu sua invaginação. Estes dados também não excluem a possibilidade de que o anel de actina no placóide possa desempenhar os dois papéis, o de contração e o de manutenção das Junções Aderentes.

Com os dados apresentados acima demonstramos que a constrição celular apical poderia contribuir para a invaginação do placóide do cristalino em embriões de galinha. A observação da ocorrência do mecanismo de constrição celular apical em modelos animais tão diversos quanto *Drosophila*, ouriço do mar e vertebrados (como *Xenopus*, galinhas e camundongos), além de ocorrer em uma gama ainda maior de tipos epiteliais, como epitélios simples (mesoderme de *Drosophila* e de ouriço do mar, intestino posterior e glândulas salivares de *Drosophila*), epitélios estratificados (mesoderme de *Xenopus*) e epitélios pseudoestratificados (como tubo neural e placóides craniais em vertebrados), revela que o mecanismo de constrição celular apical parece ser universal para gerar estruturas esféricas ou cilíndricas a partir de estruturas planas (Dietz et al., 2006; Pilot e Lecuit, 2005).

4.5 Actina filamentosa poderia atuar como restrição física que direciona a invaginação do cristalino

Diversos mecanismos devem agir em conjunto para que a invaginação do cristalino seja completada, especialmente porque o cristalino apresenta uma assimetria no sentido dorso-ventral, existindo a possibilidade de que mecanismos diversos devam agir em diferentes partes do cristalino (Hendrix et al., 1993; Schook, 1980a; Zwaan et al., 1969; Zwaan e Hendrix, 1973). Quando analisada em nível tecidual, notamos que a distribuição de actina filamentosa forma um cabo ao longo de toda porção apical do cristalino durante a invaginação. A formação destes cabos de actina foram descritos na porção apical durante o desenvolvimento dos arcos faríngeos (Quinlan et al., 2003). Cada arco faríngeo se desenvolve como um broto oco que expande lateralmente formando uma estrutura cilíndrica, semelhante ao que ocorre com a evaginação da vesícula óptica a partir do tubo neural. O tratamento dos arcos faríngeos com Citocalasina D elimina actina da porção apical dos arcos faríngeos e provoca a formação de um broto que ao se expandir, apresenta diversas convoluções na porção distal, não apresentando mais a forma cilíndrica. A presença de actina filamentosa na porção apical do cristalino, de modo semelhante ao presenciado nos arcos faríngeos, poderia proporcionar certa rigidez ao epitélio durante a morfogênese, servindo como um mecanismo que impede que as bordas do cristalino colabem durante a invaginação ou que o cristalino sofra dobramentos aleatórios, prejudicando a formação de uma vesícula (Quinlan et al., 2003; Ybot-Gonzalez e Copp, 1999).

4.6 Importância de miosina II para a manutenção da coesão tecidual e para a constrição celular apical

Miosina II poderia estar presente na porção apical para, juntamente com actina filamentosa, regular o formato celular, agindo na constrição celular apical ou atuar na manutenção da adesão celular. Diferentemente de actina filamentosa, que se associa a caderina-beta-catenina para estabilizar as Junções Aderentes e reforçar a adesão celular, miosina II possui os papéis de regular positivamente (Bao et al., 2007; Conti et al., 2004; Conti e Adelstein, 2008; Ma et al., 2007; Shewan et al., 2005) e negativamente (Ivanov et al., 2004; Sahai e Marshall, 2002) a adesão

celular. Acredita-se que estas funções antagônicas sejam resultados das diferenças na ação contrátil das diferentes isoformas de miosina II.

As três isoformas de miosina II descritas em mamíferos (miosina IIA, IIB e IIC) formam filamentos e se ligam a actina, mas apresentam propriedades bioquímicas distintas com relação à contratilidade dos filamentos de actina, sugerindo que as diferentes isoformas possam desempenhar papéis diferentes. Especificamente, miosina IIB possui uma taxa de dissociação de ADP bastante baixo, fazendo com que esta miosina passe a maior parte do seu ciclo de hidrólise de ATP associado a actina, ou seja, na forma contraída. Conseqüentemente, miosina IIB é mais estática e possui menor mobilidade na formação e na desestruturação de seus filamentos. Miosina IIA, por sua vez, possui taxa de dissociação de ADP alto e se dissocia rapidamente de actina, é rapidamente recrutada para a formação de novos filamentos, sendo importante para contrações rápidas e transitórias (Kolega, 1998; Kovacs et al., 2003; Rosenfeld et al., 2003; Wang et al., 2003).

Pelo exposto acima, seria de se esperar que miosina IIB seja mais adaptada para gerar tensões por períodos mais prolongados, desempenhando papel importante como proteína estrutural, como, por exemplo, servir na estruturação do complexo de adesão célula-célula (Bao et al., 2007; Conti et al., 2004; Conti e Adelstein, 2008; Ma et al., 2007; Kolega, 1998; Krendel e Mooseker, 2005; Wang et al., 2003).

Apesar das diferenças bioquímicas entre as isoformas de miosina II, as diferenças funcionais entre elas não são tão claras e dependem do contexto em que elas estejam sendo analisadas. Enquanto seja possível observar a preferência de determinados tecidos por isoformas diferentes, diversos tipos celulares e compartimentos sub-celulares possuem sobreposição na expressão das isoformas (Golomb et al., 2004), e em alguns casos, uma determinada isoforma pode ser substituída por outra, sugerindo que elas podem desempenhar papéis semelhantes dependendo do contexto (Abe e Takeichi, 2007; Bao et al., 2007; Conti et al., 2004; Conti e Adelstein, 2008; Delanoe-Ayari et al., 2004; Ma et al., 2007; Niessen et al., 2008; Quinlan et al., 1999; Shewan et al., 2005; Weis e Nelson, 2006).

Neste trabalho mostramos que miosina II forma um anel na porção apical do placóide do cristalino e colocaliza com actina filamentosa, podendo estar relacionado com a constrição celular apical. Mostramos, também, que a isoforma IIB de miosina está presente na porção apical do cristalino durante a invaginação. Este resultado

indica que miosina IIB poderia ser a isoforma que contribui para a invaginação do placóide do cristalino (seria interessante analisar se a isoforma IIA também estaria presente no cristalino e se desempenha algum papel na invaginação). Interessante constatar a presença de miosina IIB durante a invaginação do cristalino, uma vez que esta isoforma é descrita como sendo capaz de manter tensão no citoesqueleto de actina por períodos longos, sendo apropriada para o evento de invaginação do cristalino. Durante a invaginação, espera-se que a constrição celular apical não seja um evento transitório, mas se mantenha até que o cristalino adquira a forma de vesícula ou um estágio onde o possível retorno ao formato cilíndrico das células do cristalino, que poderia ocorrer devido ao término da constrição celular apical, não comprometa a invaginação.

Miosina II precisa ser fosforilada em uma de suas cadeias leves regulatórias para contrair plenamente (Conti e Adelstein, 2008; Ivanov et al., 2004; Ma et al., 2007; Sahai e Marshall, 2002; Wu et al., 2006). Miosina II fosforilada foi encontrada na porção apical do cristalino invaginando (ao contrário do placóide do cristalino, onde miosina II não está fosforilada), sugerindo mais uma vez que miosina II presente na porção apical do cristalino possa regular sua invaginação ao contrair a porção apical das células (neste experimento somente conseguimos detectar miosina II total fosforilada, não sendo possível identificar em qual isoforma ocorre a fosforilação). Outra função que miosina II fosforilada poderia desempenhar no cristalino invaginando seria o de desorganizar as Junções Aderentes para que estas sejam re-alocadas durante a invaginação, uma vez que a desorganização das junções necessitam a contratilidade de miosina II (veja abaixo).

Alternativamente, em vez de participar da constrição celular apical, a presença de miosina IIB na porção apical do cristalino durante a invaginação poderia significar que esta molécula esteja contribuindo para a regulação das Junções Aderentes e para a manutenção da adesão celular. No neuroepitélio, a única isoforma de miosina II presente é a IIB (Bao et al., 2007; Ma et al., 2007). Camundongos mutantes para miosina IIB apresentam dissociação do neuroepitélio, com células que delaminam do tecido e invadem o tubo neural. Uma vez que no neuroepitélio não ocorre constrição celular apical, este exemplo ilustra bem a importância de miosina IIB para a adesão celular. Da mesma forma que no neuroepitélio, encontramos miosina IIB na porção apical do cristalino, sugerindo que

miosina IIB poderia estar envolvida na manutenção das Junções Aderentes do placóide do cristalino.

4.7 As Junções Aderentes durante a morfogênese do cristalino

Durante a invaginação do mesoderme em *Drosophila*, as Junções Aderentes são dinamicamente re-organizadas. Inicialmente, as Junções Aderentes estão localizadas sub-apicalmente e com o início da invaginação, as células que sofreram a constrição celular apical e as células imediatamente laterais, que foram esticadas apicalmente em consequência da invaginação, tiveram os complexos caderina-catenina deslocados para a porção mais apical como resposta à força gerada pela contração de miosina II (Kolsh et al., 2007). Durante o desenvolvimento do cristalino, a distribuição dos complexos de adesão celular também é alterada. No estágio de placóide do cristalino, observamos que caderina e beta-catenina estão presentes nas porções laterais e apical das células, e com o início da invaginação do cristalino, caderina e beta-catenina se acumulam na porção apical.

Miosina II apresenta papel importante na manutenção das Junções Aderentes, seja regulando ativa ou negativamente a adesão celular. Conforme mencionado anteriormente, miosina II se liga a actina filamentosa e permite que os filamentos sejam estabilizados e mantidos ligados às Junções Aderentes, permitindo que as junções sejam mantidas nas membranas e favorecendo a adesão celular. A capacidade contrátil de miosina II, por sua vez, pode regular negativamente as Junções Aderentes. Com a contração dos filamentos de actina causada por miosina II, os filamentos de actina são removidos dos complexos juncionais. Sem actina ligada às Junções Aderentes, os complexos caderina-catenina deixam de se localizar nas membranas e a adesão celular é inibida. Em culturas epiteliais, por exemplo, a fosforilação e conseqüentemente a ativação da capacidade contrátil de miosina II remove as Junções Aderentes das membranas celulares e adesão celular é comprometida. Com a inibição da fosforilação de miosina II, as Junções Aderentes são mantidas, e as células permanecem aderidas (Ivanov et al., 2004; Sahai e Marshall, 2002). A contração de miosina II leva, portanto, à desestruturação das Junções Aderentes.

Condizente com esta hipótese, nós observamos a presença de miosina II fosforilada na porção apical do cristalino invaginando, mas não na porção apical do

placóide do cristalino. A presença de miosina II fosforilada durante a invaginação poderia significar que o tecido está desorganizando as Junções Aderentes presentes no estágio de placóide do cristalino para que uma nova distribuição destes elementos seja organizado em locais onde haja necessidade de reforço da adesão celular (Kolsh et al., 2007; Sahai e Marshall, 2002).

Para elucidar o papel da miosina IIB na invaginação do placóide, seria interessante superexpressar a forma mutante da miosina IIB (Arg709Cys ou R709C). Esta mutação é pontual no domínio motor da proteína, impedindo sua contratilidade, sem, contudo alterar sua ligação com actina (Ma et al., 2007). Camundongos mutantes para miosina IIB apresentam severos problemas no desenvolvimento do tubo neural, devido à perda de adesão celular no neuroepitélio. Contudo, camundongos mutantes para miosina IIB expressando a forma R709C de miosina IIB recuperam parcialmente o fenótipo de adesão celular. Em outras palavras, a contratilidade da miosina IIB não é necessária para a manutenção ou estabelecimento das junções apicais do neuroepitélio. Da mesma forma, poderíamos utilizar miosina IIB com a contratilidade comprometida para distinguir se miosina II participa da constrição celular apical ou na manutenção das Junções Aderentes no placóide do cristalino.

4.8 Papel de RhoA na invaginação do cristalino

A GTPase RhoA é suficiente e necessária para que a invaginação do mesoderme de *Drosophila* e de ouriço do mar ocorra (Beane et al., 2006; Barrett et al., 1997; Dawes-Hoang et al., 2005; Fox e Peifer, 2007), além disso RhoA está envolvida na invaginação das glândulas salivares de *Drosophila* (Nikolaidou et al., 2004), da placa neural e da vesícula ótica em vertebrados (Kinoshita et al., 2008; Sai e Ladher, 2008). RhoA é primariamente um regulador do citoesqueleto de actina e miosina II, sendo necessário, por exemplo, para a polimerização dos filamentos de actina (Burridge e Wennerberg, 2004; Jacinto et al., 2002), para a regulação das Junções Aderentes (Braga et al., 1997; Fukata e Kaibuchi, 2001; Kaibuchi et al., 1999; Kuroda et al., 1997; Samarin et al., 2007), para a localização apical de miosina II no mesoderme de *Drosophila* (Dawes-Hoang et al., 2005) e para a fosforilação de miosina II, ativando sua função contrátil e estabilizando os filamentos de miosina II (Conti e Adelstein, 2008; Wu et al., 2006).

Dada a importância de RhoA para a regulação do citoesqueleto e a presença de actina filamentosa e de miosina II fosforilada na porção apical do cristalino em desenvolvimento, analisamos se RhoA seria necessário para a invaginação do cristalino ou para a regulação de miosina II durante a invaginação (especificamente localização e ativação). RhoA está presente na porção apical do placóide do cristalino e continua presente na porção apical durante o processo de invaginação, apresentando um padrão de expressão que se sobrepõe à expressão de actina-miosina. A super-expressão da forma dominante-negativo de RhoA nos cristalinos não inibiu a invaginação do cristalino, não alterou a localização de miosina II e não alterou sua fosforilação.

Diferentemente de outros modelos de invaginação epitelial, onde RhoA tem papel fundamental para regular a morfogênese, a invaginação do cristalino não parece requerer RhoA. Qual seria, então, o papel de RhoA presente na porção apical do cristalino? RhoA poderia estar presente na porção apical do cristalino para regular outros aspectos do citoesqueleto, como por exemplo, a formação de actina filamentosa na porção apical do cristalino, através da regulação de forminas. Apesar de não ter sido descrita a presença de forminas no desenvolvimento do cristalino, essa classe de proteínas é responsável pela nucleação de actina, processo que inicia a formação dos filamentos de actina (Burridge e Wennerberg, 2004; Carramusa et al., 2007; Faix e Grosse, 2006; Fox et al., 2007) e já foram descritas na porção apical de epitélios que passam pelo processo de invaginação mediado pela constrição celular apical, como durante a invaginação do tubo neural em vertebrados (Homem e Peifer, 2008) e a invaginação do mesoderme de *Drosophila* (Fox e Peifer, 2007). O próximo passo em nossa análise da função de RhoA na invaginação do placóide do cristalino será analisar se a super-expressão de RhoADN altera a presença de actina filamentosa na porção apical do cristalino.

Paralelamente a RhoA, a proteína Shroom tem sido descrito como suficiente e necessário para a invaginação epitelial. Esta proteína, encontrada somente em vertebrados, está presente na porção apical do tubo neural de camundongos durante a neurulação, associado a actina cortical e a miosina II (Dietz et al., 2006; Haigo et al., 2003; Hildebrand e Soriano, 1999; Hildebrand, 2005; Lee et al., 2007). A mutação deste gene impede a localização apical de actina filamentosa e de miosina II, a constrição celular apical deixa de ocorrer e conseqüentemente impede a invaginação da placa neural (Haigo et al., 2003; Hildebrand e Soriano, 1999).

Similarmente, no anfíbio *Xenopus laevis*, Shroom está presente na porção apical somente nas células que apresentam constrição celular apical, e a super-expressão da sua forma dominante-negativa inibe a formação das células em forma de cone, presentes nos pontos que servem de dobradiças durante a invaginação do tubo neural, impedindo o fechamento do tubo neural (Haigo et al., 2003;). Para que Shroom regule a constrição celular apical, actina e miosina II são necessárias. A inibição de miosina II através de blebistatina impede a constrição celular apical em células que superexpressam Shroom (Hilderbrand, 2005). Quando RhoA é super-expresso, há a potencialização da ação de Shroom na constrição celular apical, mas quando RhoA é inibido pela super-expressão da forma dominante-negativo, a constrição celular apical continua ocorrendo, indicando que a atividade de RhoA não é necessária para a ação de Shroom. Contudo, a inibição de Rock, efector de RhoA, impede a ação de Shroom na constrição celular apical, provavelmente porque com a inibição de Rock, a fosforilação de miosina II deixa de ocorrer (Haigo et al., 2003; Hildebrand, 2005).

Estes dados levantaram a hipótese de Shroom funcionar a vazante de RhoA ou em paralelo para localizar actina e miosina apicalmente, ativando miosina II via Rock e induzindo a constrição celular apical, (Hildebrand, 2005). Neste caso, a própria molécula Shroom é responsável por ligar Rock e leva-la à membrana plasmática (Nishimura e Takeichi, 2008). Porém, ainda não foi esclarecido qual molécula é capaz de ativar Rock nos casos onde RhoA foi inibido com a super-expressão de RhoA DN.

A participação de um mecanismo paralelo de regulação do citoesqueleto e da constrição celular apical poderia explicar porque apesar da sabida importância de RhoA para a regulação do citoesqueleto e para a invaginação epitelial em diversos modelos, o cristalino poderia dispensar RhoA, mas não Rock para a invaginação (Richard Lang, comunicação pessoal).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos evidências de que a constrição celular apical pode ser um mecanismo que contribui para a invaginação do placóide do cristalino. A evidência de que a constrição celular pode estar relacionada com a invaginação do cristalino não elimina, porém, a possibilidade de outros eventos participarem desta morfogênese.

O citoesqueleto é extremamente complexo, e a regulação de seus diversos componentes deve ser precisamente coordenada para que as células modifiquem seu comportamento segundo um roteiro presente em nível maior, o do organismo, para que no final da embriogênese possa surgir um organismo viável. A descrição de elementos do citoesqueleto durante a morfogênese do cristalino permite, portanto, que novos elementos regulatórios e estruturais possam ser implicados no desenvolvimento do cristalino, ampliando nosso entendimento de como esta estrutura se forma.

Com isto, propomos o seguinte modelo para descrever a invaginação do placóide do cristalino (Fig. 20). Inicialmente, Junções Aderentes, actina filamentosa, miosina II e RhoA se localizam em todo o contorno celular. Com a formação do placóide do cristalino, RhoA se localiza apicalmente, assim como os elementos contráteis. Com a localização apical dos elementos contráteis, miosina se torna fosforilada e contrai a porção apical das células, fazendo o placóide do cristalino invaginar. Adicionalmente, a contração de miosina II desorganiza as Junções Aderentes, que são re-organizadas na porção apical, reforçando a coesão tecidual durante a invaginação.

Figura 20 – Modelo para a dinâmica de elementos do citoesqueleto durante a morfogênese do cristalino. Inicialmente, o ectoderme pré-cristalino é um epitélio cubóide que apresenta actina filamentosa e miosina II nas porções laterais das células. O mesmo ocorre para elementos de adesão celular (o complexo caderina e beta-catenina) e para RhoA (A). Com o alongamento das células e formação do placóide do cristalino (B), RhoA, actina filamentosa e miosina II se concentram apicalmente, enquanto que os complexos de adesão se mantêm nas membranas laterais. Uma vez na porção apical, miosina II é fosforilada (C) e contrai o citoesqueleto de actina, reduzindo o perímetro celular apical e causando a invaginação do cristalino (D). Somente após a invaginação do cristalino, os elementos de adesão celular são re-organizados e se acumulam apicalmente (D).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Abe K, Takeichi M. Eplln mediates linkage of the cadherin-catenin complex to f-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Nat Acad Sci*. 2008;105(1):13-9.
- Angres B, Barth A, Nelson WJ. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. *J Cell Biol*. 1996;134(2):549-57.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorilation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-9.
- Bao J, Ma X, Liu C, Adelstein R. Replacement of nonmuscle myosin II-B with II-A rescues brain but not cardiac defects in mice. *J Biol Chem*. 2007;282(30):22102-11.
- Bancroft M, Bellairs R. Placodes of the chick embryo studied by SEM. *Anat Embryol (Berl.)*. 1977;151(1):97-108.
- Barrett K, Leptin M, Settleman J. The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell*. 1997;91(7):905-15.
- Beane WS, Gross JM, McClay DR. RhoA regulates initiation of invagination, but not convergent extension, during sea urchin gastrulation *Dev Biol*. 2006;292(1):213-25.
- Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol*. 2006;290(1):44-56.
- Braga VMM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 1997;137(6):1421-31.
- Brugmann SA, Moody SA. Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell*. 2005;97(5):303-19.
- Burrige K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116(2):167-79.
- Carramusa L, Ballestrem C, Zilberman Y, Bershadsky AD. Mammalian diaphanous-related formin Dia1 controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 21):3870-82.
- Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn*. 2001;220(3):284-9.
- Chu YS, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP, Dufour S. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion

- strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol.* 2004;167(6):1183-94.
- Colas JF, Schoenwolf GC. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn.* 2001;221(2):117-45.
- Concha ML, Adams RJ. Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. *Development.* 1998;125(6):983-94.
- Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein R. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41263-66.
- Conti MA, Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 1):11-18.
- Copp AJ. Neurulation in the cranial region – normal and abnormal. *J Anat.* 2005;207(5):623-35.
- Cox RT, Kirkpatrick C, Peifer M. Armadillo is required for Adherens Junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol.* 1996;134(1):133-48.
- Dawes-Hoang RE, Parmar KM, Christiansen AE, Phelps CB, Brand AH, Wieschaus EF. Folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization. *Development.* 2005;132(18):4165-78.
- Delanoë-Ayari H, Al Kurdi R, Vallade M, Gulino-Debrac D, Riveline D. Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2229-34.
- DePina AS, Wöllert T, Langford GM. Membrane associated nonmuscle myosin II functions as a motor for actin-based vesicle transport in clam oocyte extracts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007;64(10):739-55.
- Dietz ML, Bernaciak TM, Vendetti F, Kielec JM, Hildebrand JD. Differential actin-dependent localization modulates the evolutionary conserved activity of shroom family proteins. *J Biol Chem.* 2006;281(29):20542-54.
- Dimanlig PV, Faber SC, Auerbach W, Makarenkova HP, Lang RA. The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development.* 2001;128(22):4415-24.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Alfa-catenin is a molecular switch that binds e-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 2005;123(5):903-15.

Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AAC, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol.* 1992;119(6):1541-57.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-35.

Faber SA, Dimanlig P, Makarenkova HP, Shirke S, Ko K, Lang RA. Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development.* 2001;128(22):4425-38.

Faix J, Grosse R. Staying in shape with formins. *Dev Cell.* 2006;10(6):693-706.

Forti FL, Armelin HA. Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(4):1117-25.

Fox DT, Peifer M. Abelson kinase (Abl) and RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in *Drosophila*. *Development.* 2007;134(3):567-78.

Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(12):887-897.

Gato A, Martin C, Alonso MI, Martinez-Alvarez C, Moro JA. Chondroitin sulphate proteoglycan is involved in lens vesicle morphogenesis in chick embryos. *Exp Eye Res.* 2001;73(4):469-78.

Gehring WJ. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Zoology.* 2001;104(3-4):171-83.

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

Golomb E, Ma X, Jana SS, Preston YA, Kawamoto S, Shoham NG, Goldin E, Conti MA, Sellers JR, Adelstein RS. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2800-08.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):622-34.

Hackett DA, Smith JL, Schoenwolf GC. Epidermal ectoderm is required for full elevation and for convergence during bending of the avian neural plate. *Dev Dyn.* 1997;210(4):397-406.

- Haigo SL, Hildebrand JD, Harland RM, Wallingford JB. Shroom induces apical constriction and is required for hinge point formation during neural tube closure. *Curr Biol*. 2003;13(24):2125-37.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951;88(1):49-92.
- Hendrix RW, Zwaan J. The matrix of the optic vesicle-presumptive lens interface during induction of the lens in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1975;33(4):1023-49.
- Hendrix R, Madras N, Johnson R. Growth pressure can drive early chick lens geometries. *Dev Dyn*. 1993;196(3):153-64.
- Hildebrand JD, Soriano P. Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell*. 1999;99(5):485-97.
- Hildebrand JD. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 22):5191-203.
- Homem CC, Peifer M. Diaphanous regulates myosin and adherens junctions to control cell contractility and protrusive behavior during morphogenesis. *Development*. 2008;135(6):1005-18.
- Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2639-51.
- Ivanov AI, Bachar M, Babbitt BA, Adelstein RS, Nusrat A, Parkos CA. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS ONE*. 2007;2(7):e658.
- Jacinto A, Baum B. Actin in development. *Mech Dev*. 2003;120(11):1337-49.
- Junghans D, Hack I, Frotscher M, Taylor V, Kemler R. Beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. *Dev Dyn*. 2005;233(2):528-39.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(5):591-6.
- Kam Z, Minden JS, Agard DA, Sedat JW, Leptin M. Drosophila gastrulation: analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy. *Development*. 1991;112(2):365-70.
- Kamisoyama H, Araki Y, Ikebe M. Mutagenesis of the phosphorylation site (serine 19) of smooth muscle myosin regulatory light chain and its effects on the properties of myosin. *Biochemistry*. 1994;33(3):840-7.

- Kinoshita N, Sasai N, Misaki K, Yonemura S. Apical accumulation of rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):2289-99.
- Kolega J. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial “sorting” of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci*. 1998;111(Pt 15):2085-95.
- Kolsch V, Seher T, Fernandez-Bzllester GJ, Serrano L, Leptin M. Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of Adherens Junctions and RhoGEF2. *Science*. 2007;315(5810):384-386.
- Kominami T, Takata H. Gastrulation in the sea urchin embryo: A model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Develop Growth Differ*. 2004;46(4):309–326.
- Kovács M, Wang F, Hu A, Zhang Y, Sellers JR. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38132-40.
- Krendel M, Mooseker MS. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:239-51.
- Kuroda S, Fukata M, Fujii K, Nakamura T, Izawa I, Kaibuchi K. Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(2):430-5.
- Lang RA. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8-9):783-91.
- Lee JY, Harland RM. Actomyosin contractility and microtubules drive apical constriction in *Xenopus* bottle cells. *Dev Biol*. 2007;311(1):40-52.
- Lovicu FJ, McAvoy JW. Growth factor regulation of lens development. *Dev Biol*. 2005;280(1):1-14.
- Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell*. 2007;18(6):2305-12.
- Marston DJ, Goldstein B. Actin-based forces driving embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16(4):392-8.
- Martinez-Morales JR, Rodrigo I, Bovolenta P. Eye Development: a view from the retina pigmented epithelium. *BioEssays*. 2004;26(7):766-77.
- Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*. 2005;15(7):371-7.

- Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 1998;279(5350):527-33.
- Messier PE. Microtubules, interkinetic nuclear migration and neurulation. *Experientia*. 1978;34(3):289-96.
- McKeehan MS. Cytological aspects of embryonic lens induction in the chick. *J Exp Zool*. 1951;117(1):31-63.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, Yasuda K. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ*. 1999;41(3) 335-44.
- Mulinari S, Barmchi MP, Häcker U. DRhoGEF2 and Diaphanous Regulate Contractile Force during Segmental Groove Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):1883-92.
- Nikolaidou KK, Barrett K. A Rho GTPase signaling pathway is used reiteratively in epithelial folding and potentially selects the outcome of Rho activation. *Curr Biol*. 2004;14(20):1822-6.
- Mège RM, Gavard J, Lambert M. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):541-8.
- Nakajima Y, Burke RD. The Initial Phase of Gastrulation in Sea Urchins Is Accompanied by the Formation of Bottle Cells. *Dev Biol*. 1996;179(2):436–46.
- Nishimura T, Takeichi M. Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development*. 2008;135(8):1493-502.
- Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):562-71.
- Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci*. 2005;118(10):2085-92.
- Ogino H, Yasuda K. Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Develop Growth Differ*. 2000;42(5):437-48.
- Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeleton dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*. 2004;14(7):386-94.
- Pilot F, Lecuit T. Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev Dyn*. 2005;232(3),685-94.

- Quinlan MP, Hyatt JL. Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin-catenin complex in epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 1999;10(12):839-54.
- Quinlan R, Martin P, Graham A. The role of actin cables in directing the morphogenesis of the pharyngeal pouches. *Development.* 2004;131(3):593-599.
- Quintin S, Gally C, Labouesse M. Epithelial morphogenesis in embryos: asymmetries, motors and brakes. *Trends Genet.* 2008;24(5):221-30.
- Bancroft M, Bellairs R. Placodes of the chick embryo studied by SEM. *Anat Embryol (Berl).* 1977;151(1):97-108.
- Sahai E, Marshall CJ. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol.* 2002;4(6):408-15.
- Sai X, Ladher RK. FGF signaling regulates cytoskeletal remodeling during epithelial morphogenesis. *Curr Biol.* 2008;18(13):976-81.
- Samarin SN, Ivanov AI, Flatau G, Parkos CA, Nusrat A. Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell.* 2007;18(9):3429-39.
- Sellers JR, Veigel C. Walking with myosin V. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(1):68-73.
- Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbens SJ, Verma S, Kovacs EM, Yap AS. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):4531-42.
- Schlosser G. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol.* 2006;294(2):303-51.
- Schök F, Perrimon N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:463-93.
- Schook, P. Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. A light microscopic spatial reconstructive study. *Acta Morphol Neerl Scand.* 1980a;18(1):1-30.
- Schook P. Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. An ultrastructural and spatial reconstructive study. A. Invagination of the lens placode. *Acta Morphol Neerl Scand.* 1980b;18(23):133-57.
- Smith AN, Miller LA, Song N, Taketo MM, Lang RA. The duality of beta-catenin function: a requirement in lens morphogenesis and signaling suppression of lens fate in periocular ectoderm. *Dev Biol.* 2005;285(2):477-89.

- Sullivan CH, Braunstein L, Hazard-Leonards RM, Holen AL, Samaha F, Stephens L, Grainger RM. A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8-9):771-82.
- van Straaten HW, Sieben I, Hekking JW. Multistep role for actin in initial closure of the mesencephalic neural groove in the chick embryo. *Dev Dyn*. 2002;224(1):103-8.
- Sweeton D, Parks S, Costa M, Wieschaus E. Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development*. 1991;112:775-789.
- Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell*. 2002;3(3):367-81.
- Visconti RP, Hilfer SR. Perturbation of extracellular matrix prevents association of the otic primordium with the posterior rhombencephalon and inhibits subsequent invagination. *Dev Dyn*. 2002;223(1):48-58.
- Wang F, Kovacs M, Hu A, Limouze J, Harvey EV, Sellers JR. Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *Biol Chem*. 2003;278(30):27439-48.
- Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem*. 2006;281(47):35593-7.
- Wessells NK, Spooner BS, Ash JF, Bradley MO, Luduena MA, Taylor EL, Wrenn JT, Yamaa K. Microfilaments in cellular and developmental processes. *Science*. 1971;171(967):135-43.
- Winder SJ, Ayscough KR. Actin-binding proteins. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 4):651-4.
- Wrenn JT, Wessells NK. An ultrastructural study of lens invagination in the mouse. *J Exp Zool*. 1969;171(3):359-67.
- Wride MA. Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation*. 1996;61(2):77-93.
- Wu D, Asiedu M, Adelstein RS, Wei Q. A novel guanine nucleotide exchange factor MyoGEF is required for cytokinesis. *Cell Cycle*. 2006;5(11):1234-9.
- Wurm A, Sock E, Fuchshofer R, Wegner M, Tamm ER. Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):895-907.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 2005;123(5):889-901.

Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:119-46.

Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev Dyn.* 1999;215(3):273-83.

Young PE, Pesacreta TC, Kiehart DP. Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 1991;111(1):1-14.

Zalik SE, Lewandoski E, Kam Z, Geiger B. Cell adhesion and the actin cytoskeleton of the enveloping layer in the zebrafish embryo during epiboly. *Biochem Cell Biol.* 1999;77(6):527-42.

Zwaan J, Bryan PR Jr, Pearce TL. Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1969;21(1):71-83.

Zwaan J, Hendrix RW. Changes in cell and organ shape during early development of the ocular lens. *Am Zool.* 1973;13(4):1039-49.

Zwaan J, Webster EH Jr. Histochemical analysis of extracellular matrix material during embryonic mouse lens morphogenesis in an aphakic strain of mice. *Dev Biol.* 1984;104(2):380-9.