Carolina Purcell Goes

**Regulação da expressão do gene *cScratch2*
na embriogênese neural**

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

São Paulo
2015

Carolina Purcell Goes

**Regulação da expressão do gene *cScratch2*
na embriogênese neural**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientação: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Goes, Carolina Purcell.

Regulação da expressão do gene cScratch2 na embriogênese neural
/ Carolina Purcell Goes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. 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: Clonagem e estudo funcional do gene Scratch2 no
embrião de galinha.

Versão do título para o inglês: Regulation of cScratch2 gene
expression in neural embryogenesis.

1. Neurogênese 2. Scratch 3. Fator de transcrição 4. Regulação
gênica 5. Elementos cis 6. Tubo neural I. Yan, Profa. Dra. Chao
Yun Irene II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual III. Título.

ICB/SBIB022/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Purcell Goes.

Título da Dissertação: Regulação da expressão do gene cScratch2 na embriogênese neural.

Orientador(a): Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan.

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

☐ **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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **025** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Chao Yun Irene Yan**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Embriologia muscular do sistema nervoso de vertebrados*" do qual participam o(s) aluno(s), **Felipe Vieceli, Maraysa de Oliveira Melo, Tatiane Kanno, Carolina Purecell,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **29.04.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 29 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEBIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Aos meus pais, irmão e avós, todo o carinho,
apoio e incentivo recebido, retribuo com uma
gota de Ciência.*

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos mais que especiais aos meus pais, irmão e avós por todo empenho, suor, saudade, apoio e incentivo. Sem vocês, certamente, eu não chegaria ao final de mais uma etapa.

À minha orientadora Dra. Irene Yan por acreditar em mim, pelo incentivo, conhecimento e pelos puxões de orelha. Cresci muito!

Aos Professores Dr. Anselmo Moriscot, Dra. Telma Zorn, Dra. Dânia Hamassaki e Dra. Edna Kimura pela disponibilização de seu laboratório para realização de parte dos experimentos deste trabalho.

À USP, desde os seguranças na entrada de pedestres até a biblioteca. Aos técnicos pelo suporte. À Regina Valbom pelo apoio sempre ágil e simpático acerca das burocracias e desesperos da pós-graduação.

Aos colegas de departamento pela convivência, conversas de corredor e ajuda nos bons e maus momentos. Aos companheiros de laboratório pela paciência, momentos de descontração, ajuda, troca de conhecimento e crescimento profissional.

Um “xêro goxtôso” pra família e amigos que estão no Nordeste: Natália Amorim, Cllycia Galvão e meus tios Silvana e Luiz Fernando. Obrigada pelo carinho de sempre. Não largo vocês por nada!

E por fim, mas não menos importante, às duas “crazy” que toparam dividir casa comigo. Obrigada por tooooda paciência! Eu sei que não sou fácil. Mazinha, tesourinho de São Paulo, você é demais! Obrigada por compartilhar uma vida fitness, pelas risadas, baladinhas, conversas, desabafos acadêmicos e aprendizados.

Uma breve história:

Quando eu tinha uns 14-15 anos e ainda morava em Maceió, meus amigos de classe certa vez riram de mim, pois eu disse que um dia estudaria na USP. Agradeço por isso também. Obrigada às pessoas que passaram pela minha vida, principalmente nestes dois últimos anos. Aos que vieram e foram ou ficaram, cada um deixou sua marca, contribuindo para o meu crescimento.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

(Marcelo Camelo)

RESUMO

Goes, CP. Regulação da expressão do gene *cScratch2* na embriogênese neural. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O desenvolvimento neural inicia-se através da neurulação. Com o fechamento do tubo neural, forma-se uma camada de células proliferativas que caracterizam a zona ventricular. A transição de uma célula proliferativa para o estado pós-mitótico é um processo intensamente regulado através de genes proneurais. Os eventos posteriores de diferenciação são regidos por uma cascata molecular bem definida, que também está intimamente ligada ao processo de migração neural. Dentre os genes de diferenciação, *Scratch2* (*Scrt2*) é um fator de transcrição expresso em células neurais recém-egressas do ciclo mitótico, responsável pela sobrevivência, diferenciação e migração. *cScrt2* é expresso em uma população bastante restrita de células na camada interna da zona intermediária do tubo neural de embriões de galinha, e este padrão se mantém conservado em outros vertebrados. Apesar disso, o mecanismo de regulação de sua transcrição permanece desconhecido. Como tal, a ausência de *Scrt2* na região subventricular e ventricular sugere que sua expressão possa ser controlada por fatores de transcrição presentes nestas regiões. Neste trabalho, nós buscamos por potenciais elementos *cis*-regulatórios na região gênômica de *cScrt2* e por possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição. Nós testamos a função biológica da região *cis*-regulatória intrônica através de eletroporação de um plasmídeo repórter em embrião de galinha. A região *cis*-regulatória candidata à *enhancer* de *cScrt2* eletroporada no tubo neural, levou à expressão de *eGFP* no tubo neural, contudo, não simulou o padrão de expressão do *cScrt2* endógeno. Estes dados sugerem que a região *cis*-regulatória candidata contribui com o controle da expressão de *cScrt2*, mas que talvez também necessite da interação com outras regiões regulatórias. Nós também verificamos o papel dos fatores de transcrição *mAsh1*, *cPax6*, *cNgn2* e *Brn* na regulação da expressão de *cScrt2* através da superexpressão destes fatores no tubo neural de galinhas em desenvolvimento. As análises da expressão gênica foram realizadas através de qPCR e hibridação *in situ*. *mAsh1* levou a um leve aumento na expressão de *cScrt2* endógeno, visto através da hibridação *in situ*. Já a superexpressão de *cPax6* e *mBrn-Eng* reduziu os níveis de *cScrt2*, com *Brn* apresentando efeitos mais severos. Por fim, nós propomos que *Brn* possa inibir a transcrição de *cScrt2* indiretamente através de *cNgn2* ou mediante sua ligação direta aos elementos *cis* de *cScrt2*.

Palavras-chave: Neurogênese. Scratch. Fatores de transcrição. Regulação gênica. Elementos-*cis*. Tubo neural

ABSTRACT

Goes, CP. Regulation of *cScratch2* gene expression in neural embryogenesis. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The morphological aspects of neural development start with neurulation. The closed neural tube contains a layer of proliferating cells that characterize the ventricular zone. The transition from a proliferative to a post-mitotic state is a process strongly regulated by proneural genes. The posterior differentiation events are controlled by a well-defined molecular cascade, which is also closely linked to the neural migration process. *Scratch2* (*Scrt2*) is a transcription factor expressed in early post-mitotic neural cell responsible for survival, differentiation and migration. *cScrt2* is expressed in a very restricted population of cells in the inner layer of the intermediate zone of the chick embryonic neural tubes, and this pattern remains conserved in other vertebrates. However, the mechanisms that control its transcription remain unknown. As such, the absence of *Scrt2* expression in the ventricular and subventricular zones suggests that its expression could be controlled by transcription factors present in these regions. In this study, we searched the genomic region of *cScrt2* for potential *cis*-regulatory elements and putative transcription factors binding sites. We tested the biological function of a candidate intronic *cis*-regulatory (enhancer) region through electroporation of a reporter plasmid in chick embryos. This candidate *cis*-regulatory element of *cScrt2* drove *eGFP* expression in whole neural tube of chick embryo, although its expression did not resemble the *cScrt2* endogenous pattern. This data suggests that the candidate *cis*-regulatory region could contribute towards control of *cScrt2* expression, but that it maybe requires the interaction with other regulatory regions. We also evaluated the role of the transcription factors *mAsh1*, *cPax6*, *cNgn2* e *Brn* in regulating *cScrt2* expression through overexpression of these factors in developing chick neural tubes. Analyses of gene expression were performed using qPCR and *in situ* hybridization. The overexpression of *mAsh1* led to a slight increase in *cScrt2* expression level as seen by *in situ* hybridization. However, the overexpression of *cPax6* and *mBrn-Eng*, demonstrated a reduction in *cScrt2* levels, in which *Brn* showed the most severe effects. Finally, we propose that *Brn* could inhibit the *cScrt2* transcription indirectly through *cNgn2* or by its direct binding to genomic *cis*-elements presents near the coding region of *cScrt2*.

Keywords: Neurogenesis. Scratch. Transcription factors. Gene regulation. *Cis*-elements. Neural tube.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrando o processo de neurulação..	24
Figura 2: Ilustração de corte transversal do tubo neural.	25
Figura 3: Mecanismo de inibição lateral pela via Delta-Notch.	28
Figura 4: Hibridação in situ para marcadores conhecidos do desenvolvimento neural.	30
Figura 5: Expressão embrionária de cScrt2.	31
Figura 6: Esquema da estrutura proteica dos membros da superfamília Snail/Slug.	33
Figura 7: Estrutura do gene cScrt2.	34
Figura 8: Sequência intrônica de cScrt2 como uma possível região regulatória.	53
Figura 9: Co-electroporação de pTKeGFP-intron80 e pCMVLifeActTagRFP no tubo neural truncal e avaliação qualitativa da expressão (AQ Expressão).	56
Figura 10: Intron80 não promove a expressão de GFP em células da crista neural.	58
Figura 11: Análise <i>in silico</i> para sítios reconhecidos por fatores de transcrição específicos na região genômica de cScrt2.	61
Figura 12: Gráficos demonstrativos de alteração dos níveis de expressão através de RT-qPCR.	65
Figura 13: Panorama dos efeitos visualizados, pós-eletroporação, sobre os níveis de expressão de cScrt2.	68
Figura 14: ECR com a possível sequência para miRNAs.	69
Figura 15: Modelo da rede de interações obtida envolvendo cScrt2 e padrão de expressão dos genes envolvidos.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para RT-qPCR.....	49
Tabela 2: Análise do intron80 para sítios de ligação para fatores de transcrição.	60
Tabela 3: Análise <i>in silico</i> para miRNAs.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ascl1/Ash1 - Achaete-Scute Homolog 1

bHLH - *basic Helix-Loop-Helix*

BrdU - Bromodeoxiuridina

Brn2/POU3F2 – Brain2/POU class 3 homeobox 2

cAsh1 – Chicken Achaete-Scute Homolog 1

Ccnd1 - Cyclin-D1

Ccne1/2 - Cyclin-E1/2

Cdh1 - Cadherin-1

Cdk 1/2/5 – Cyclin-dependent kinase 1/2/5

ced-3/4 – Cell death 3/4

cSrt2 – Chicken Scratch2

DMSO - Dimetilsulfoxido

dNTP - deoxiNucleotídeos

ECR – *Evolutionary Conserved Region*

H3K27Ac – Acetilação da lisina 27 da histona 3

H3K27Me3 - Trimetilação da lisina 27 da histona 3

H3K4Me1 – Metilação da lisina 4 da histona 3

H3K4Me3 - Trimetilação da lisina 4 da histona 3

H3K9ME2 - Bimetilação da lisina 9 da histona 3

HES - Hairy and Enhancer of Split

Islet1 - Insulin gene enhancer protein

mAsh1 – mouse Achaete-Scute Homolog 1

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NeuroD2 - Neurogenic differentiation factor 2

NeuroD4/NeuroM - neuronal differentiation 4

Ngn 1/2 – Neurogenin 1 / Neurogenin 2

NICD - Notch Intracellular Domain

Olig2 - Oligodendrocyte transcription fator

Pax6 - Paired box 6

Puma - p53-upregulated modulator of apoptosis

SCG10 - Superior cervical ganglion-10

Scrt2 – *Scratch2* (genérico)

Snai 1/2 - *Snail 1/Slug*

Snail3/Smuc - *Snail-related transcription factor of muscle cells*

SOC – Meio SOB + 20 mM glicose

Sox1/2/3 - *SRY (sex determining region Y)-box 3*

SSC – Citrato de sódio + Ácido cítrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Neurulação e diferenciação neural	23
1.2 Eventos pós-mitóticos	25
1.3 Vias de sinalização que regulam o egresso do ciclo celular	26
1.4 Neurogênese e cascata neurogênica	29
1.5 <i>cScrt2</i> – um fator de transcrição pós-mitótico	30
1.6 <i>Scratch2</i> no desenvolvimento neural	32
1.7 Estrutura gênica codificante e disposição genômica	33
1.8 Regulação gênica	34
1.9 miRNAs	36
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Análise <i>in silico</i>	39
3.2 Clonagem do <i>intron80</i>	40
3.3 Transformação de bactérias e purificação	41
3.4 Sequenciamento	43
3.5 Clonagem de <i>Ngn2</i> e <i>cScrt2</i>	44
3.6 Clonagem de <i>cPax6</i>	45
3.7 Incubação e coleta de embriões de <i>Gallus gallus</i>	46
3.8 Eletroporação no embrião <i>in ovo</i>	46
3.9 Imunohistoquímica	47
3.10 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)	48
3.11 Hibridação <i>in situ</i>	50
3.12 Imagens	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Elementos <i>Cis</i>	52
4.1.1 Análise <i>in silico</i> do <i>intron</i>	52
4.1.2 Análise <i>in vivo</i>	53
4.2 Elementos <i>Trans</i>	59
4.2.1 Análise <i>in silico</i> do <i>intron</i>	59
4.2.2 Análise <i>in vivo</i>	61
4.2.2.1 RT-PCR quantitativo	63
4.2.2.2 Hibridação <i>in situ</i>	65
4.3 Outros elementos regulatórios - Análise <i>in silico</i> para miRNAs	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurulação e diferenciação neural

A neurulação é um processo constituído de múltiplas etapas que culminam na definição anato-molecular do sistema nervoso. Com a formação dos folhetos embrionários, após a gastrulação, há a diferenciação da ectoderme, em ectoderme não-neural e, centralmente, em neuroectoderme, também chamada de placa neural. Esta é delimitada molecularmente por sinais produzidos pela notocorda subjacente. Histologicamente, a placa neural é identificada pelo espessamento da ectoderme, sendo neste momento composto por células colunares. Os movimentos morfogenéticos da neurulação levam à invaginação da placa neural, formando o sulco neural (prospectivo tubo neural) e fusão das dobras neurais na região dorsal. Ao final deste processo, temos a formação do tubo neural abaixo da epiderme (oriunda da ectoderme não-neural) e, posteriormente, a origem e migração das células da crista neural provenientes da dobras neurais e células do teto do tubo neural (Fig. 1) (Gammill, Bronner-Fraser, 2003).

O neuroepitélio do tubo neural recém-formado é constituído principalmente por células proliferativas de precursores neurais. Estas células estão localizadas ao redor do ventrículo (ou canal neural), caracterizando, com o evoluir do desenvolvimento, a chamada zona ventricular (Fig. 2).

Figura 1: **Esquema ilustrando o processo de neurulação.** (A) Inicialmente, a ectoderme é formada por células cuboidais. Sob a ação da notocorda, as células de uma área central, as quais se alongam, tornando-se colunares. Estas células colunares caracterizam a neuroectoderme (placa neural, em lilás), enquanto as células laterais à placa neural constituem a ectoderme não-neural (azul-claro). (B) Após, há a indução e dobramento da placa neural, fazendo com que a mesma invagine para dentro do embrião, tomando a forma de “U” e sendo chamada de goteira ou sulco neural. (C) Em um terceiro momento, há a fusão das dobras neurais na região dorsal do tubo neural. (D) Finalmente, com a fusão das dobras neurais, temos a formação do tubo neural abaixo da epiderme proveniente da ectoderme não-neural e a delaminação e migração das células da crista neural (verde). Adaptado de: Gammill, Bronner-Fraser, 2003.

Com o progresso do desenvolvimento, o neuroepitélio gera, por divisão assimétrica, os primeiros neurônios. Estes se organizam em camadas concêntricas ao redor da luz. Desta forma, o tubo neural se converte em um tecido de múltiplas camadas. A zona ventricular é a mais apical e interna do tubo neural, circundando o canal neural e abrigando a grande maioria das células progenitoras, as chamadas células radiais gliais (Madarász, 2013). As camadas adjacentes e mais externamente diferenciadas são respectivamente conhecidas como zonas subventricular, intermediária e do manto (Fig. 2). Além das divisões mitóticas assimétricas, também ocorrem na zona ventricular as divisões mitóticas simétricas

(Shitamukai, Matsuzaki, 2012). Nas divisões simétricas, ambas células-filhas permanecem na zona ventricular, renovando o *pool* celular proliferativo. Estas células, posteriormente, poderão gerar neurônios de forma direta ou indireta, sendo que esta última gera um precursor neural intermediário. Já nas divisões assimétricas, somente uma célula-filha permanece aderida à zona ventricular, enquanto que a outra inicia um processo de egresso do ciclo celular, início de diferenciação e migração centro-periférica, tornando-se um progenitor intermediário, ou neurônio, em camadas adjacentes mais externas (Fig. 2) (Gotz, Huttner, 2005; Madarász, 2013). Assim, este processo também pode ser chamado de modo indireto de neurodiferenciação, devido à formação de neurônios através de um progenitor intermediário.

Figura 2: **Ilustração de corte transversal do tubo neural.** (A) Indicação das subdivisões adquiridas pelo tubo neural com a progressão do desenvolvimento. Centralmente está localizado o canal neural (em marrom escuro), seguido da zona ventricular, contendo as células proliferativas (em preto). Adjacente a esta última, no sentido centro-periférico, estão as zonas intermediária e do manto, respectivamente. A zona intermediária é constituída por células recém-egressas do ciclo celular e progenitores intermediários, enquanto a zona do manto, células diferenciadas, como neurônios, corpos celulares de motoneurônios e células da glia. Em (B) está demonstrado o método de divisão assimétrica. Inicialmente, uma célula progenitora (CP), localizada na zona ventricular, divide-se assimetricamente, mantendo uma das células-filha aderida à esta região proliferativa, enquanto a outra célula-filha, sai do ciclo celular, inicia um processo de diferenciação e começa a migrar para a zona intermediária, onde passa a ser chamada de progenitor intermediário (PI). Este progenitor, então, continua sua diferenciação e é encontrado na zona do manto como uma célula diferenciada (CD).

1.2 Eventos pós-mitóticos

A transição de uma célula proliferativa para o estado pós-mitótico é um processo intensamente regulado. Para isto, genes proneurais tem um papel importante, atuando não só na regulação da parada do ciclo celular como também no início da diferenciação neural.

Estes eventos de diferenciação são regidos por uma cascata molecular bem definida, que também está intimamente ligada ao processo de migração neural (Ge et al., 2006). Como dito anteriormente, células proliferativas de precursores neurais localizam-se

exclusivamente na zona ventricular. À medida que saem do ciclo celular e se comprometem com a diferenciação, reduzem a expressão de proteínas de junções aderentes, delaminam e começam a migrar em direção à membrana basal (superfície pial) para ocupar, progressivamente, camadas mais externas do tubo neural. A partir deste ponto, as camadas são caracterizadas de acordo com a evolução da diferenciação e, então, classificadas em zona intermediária e do manto.

Concomitante a este processo migratório, há a ativação sequencial e precisa de genes que regulam a transição do estado proliferativo para a diferenciação pós-mitótica (Diez del Corral, Storey, 2001). Dessa forma, o destino das células proliferativas poderá ser determinado de acordo com seu perfil particular de expressão gênica resultante da ativação e/ou repressão de genes. Isto, posteriormente, definirá a localização espaço-temporal de subtipos neurais específicos que subdividem o tubo neural em domínios distintos. Além disto, os progenitores neurais geram os diferentes tipos celulares seguindo um cronograma característico. Por exemplo, os progenitores neurais inicialmente se diferenciam em neurônios e, numa etapa posterior, em células da glia (Gotz, Huttner, 2005; Guillemot, 2007).

1.3 Vias de sinalização que regulam o egresso do ciclo celular

Dentre as vias de sinalização que iniciam uma cascata regulatória de genes proneurais responsáveis pela diferenciação (Bertrand et al., 2002), uma que se destaca é a via Notch, uma proteína transmembrana, evolutivamente conservada, que atua através de interações celulares locais (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). A ativação da via Delta-Notch reprime a transcrição de genes neurogênicos e mantém as células em estado indiferenciado (Louvi, Artavanis-Tsakonas, 2006) (Fig. 3). A ativação do receptor Notch pelas proteínas transmembrana DELTA ou JAGGED resulta na clivagem do domínio intracelular de Notch (NICD), o seu transporte para o núcleo e a expressão dos repressores de transcrição *Hes* (Louvi, Artavanis-Tsakonas, 2006). Estes, por sua vez, reprimem genes proneurais, entre eles, os membros da superfamília *basic helix-loop-helix* (bHLH) de fatores de transcrição, que conferem às células ectodérmicas o potencial de se tornar precursores neurais (Bertrand et al., 2002; Guillemot, 2007). O resultado disso é a permanência no estado proliferativo. O egresso do ciclo celular requer a redução da sinalização da via Delta-Notch.

Dos genes proneurais do tipo bHLH conhecidos, há o complexo *Achaete-Scute*, que codifica proteínas envolvidas na segregação de neurônios e linhagens epidermais (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Outros membros da família de bHLH de fatores de transcrição proneurais são as Neurogeninas 1/2 (*Ngn1* ou *Ngn2*). Estas controlam diferentes passos da neurogênese, incluindo o comprometimento neuronal, saída do ciclo celular, especificação de subtipo celular e início da diferenciação neural (Bertrand et al., 2002; Perez et al., 1999). Quando *Ngn 1/2* é aumentada em células pós-mitóticas, ativa a expressão dos ligantes de Notch, como *Delta1* (*Dll1*), *Jagged1* (*Jag1*) e *Jagged2* (*Jag2*), que atuam na via de sinalização Delta-Notch de células radiais gliais vizinhas (Madarász, 2013). Em outras palavras, a expressão de *Ngn 1/2* deflagra um processo de regulação intercelular chamado de “inibição lateral”, que impede as células vizinhas (detentoras do receptor Notch e, portanto, suscetíveis a presença de DELTA) de seguirem o processo de diferenciação. Desse modo, a regulação da sinalização Delta-Notch por *Ngn2* leva ao balanço entre os estágios de proliferação e diferenciação numa população antes homogênea (Fig. 3) (Kageyama et al., 2008).

Em estudo publicado por Lacomme e colaboradores (2012), foram analisados diferentes perfis de transcriptoma de tubos neurais de galinha eletroporados com *Ngn2* e com um mutante de *Ngn2* que não é capaz de se ligar ao DNA e nem ativar uma cascata neurogênica no córtex, mas que ainda possui a capacidade de interagir com outras proteínas. Entre os alvos que tiveram seus níveis de expressão alterados positivamente, estão *Dll1* e *Hes6* e, negativamente, *Pax6* e *Sox1*. Estes perfis quando comparados com outros de estudos já realizados para identificação de alvos de *Ngn2* em córtex de camundongo (Gohlke et al., 2008; Mattar et al., 2004), confirmam a expressão alterada de diversos genes envolvidos em etapas distintas do desenvolvimento neural. Dentre eles, os genes *Snail 1/2*, que já foram descritos por terem como alvo a proteína E-caderina (*Cdh1*), importante nas junções aderentes célula-célula. A ligação de *Snail 1/2* na região promotora de *Cdh1* reprime sua transcrição, induzindo as células à migração e início de diferenciação (Batle et al., 2000).

Figura 3: **Mecanismo de inibição lateral pela via Delta-Notch.** Uma célula pós-mitótica tem os níveis de expressão de *Ngn2* e *mAsh1* aumentados, os quais induzem a transcrição de ligantes da via Notch, como a proteína transmembrana *Delta* (*Dll1*). A porção externa desta proteína liga-se ao receptor Notch na face externa da membrana celular da célula vizinha, ativando a via Notch. Dessa forma, a porção interna da proteína Notch, NICD, é clivada, transportada ao núcleo, e atuará na ativação da transcrição dos genes da família *Hes*, que são inibidores de genes proneurais, como *mAsh1* e *Ngn2*. Assim, esta célula que tem a via Notch ativada, se manterá em estado proliferativo. Adaptado de: Shimojo et al., 2011.

Foi visto também que *Ngn2* regula negativamente diversos genes que estão envolvidos na progressão do ciclo celular, como *Ccnd1* e *Ccne1/2*. Estes últimos, em especial, são ciclinas ativadoras de outras ciclinas parceiras (*Cdk*) e que necessitam desta interação para seu funcionamento na regulação do ciclo celular. Em particular, foi visto que apenas as ciclinas *CCDN1* e *CCNE2*, envolvidas nas fases G1 e S do ciclo celular, tiveram sua expressão reduzida, mas não a de suas *CDKs* parceiras, sugerindo, então, que apenas um subtipo específico de ciclinas tem sua expressão modificada por *Ngn2*.

Assim, a saída do ciclo celular ocorre inicialmente pela repressão de ciclinas específicas nas fases G1 e S, através de *Ngn2*, seguida da ativação de genes para diferenciação, que impedem o retorno ao ciclo mitótico. A *Ngn2* é ainda responsável por disparar a expressão de marcadores de diferenciação neural independentemente da saída do ciclo celular, sugerindo que a diferenciação é um evento controlado paralelamente à cessão do ciclo celular (Lacomme et al., 2012). Por fim, *Ngn2* confere destino neuronal às células progenitoras através da repressão de genes expressos em progenitores neurais, incluindo *Sox1/2/3* e outros envolvidos na especificação do subtipo celular, tais como *Pax6* e *Olig2* (Lacomme et al., 2012).

Em resumo, *Ngn2* é um fator de transcrição proneural bHLH, expresso no início da neurogênese, cuja presença é suficiente e necessária para a o egresso do ciclo celular e ativação da cascata de diferenciação neural (Bertrand et al., 2002).

1.4 Neurogênese e cascata neurogênica

Diversos outros fatores de transcrição proneurais são expressos e relevantes na cascata neurogênica. Dentre eles, *Ash1* (ou *Ascl1*), identificado inicialmente em *Drosophila* tem um papel central no processo. Quando seu ortólogo (*xAsh1*) é superexpresso em *Xenopus*, induz a formação de neurônios ectópicos (Talikka et al., 2002). Ainda, camundongos *knockout* para *mAsh1* apresentam graves problemas na especificação de precursores neuronais do telencéfalo ventral e no epitélio sensorial olfativo (Casarosa et al., 1999). Um estudo recente realizado no córtex cerebral, também de camundongos, demonstrou que *mAsh1* ativa de forma sequencial, positiva e negativamente, reguladores de ciclo celular como *Cdk1* e *Cdk2* (Castro et al., 2011), revelando um novo papel para *Ash1*, como fator proneural, na progressão e manutenção do ciclo celular. Neste panorama, a ação de *mAsh1* sobre o ciclo celular seria contexto-dependente: promovendo a expansão de progenitores e posteriormente, o egresso do ciclo celular durante o processo de diferenciação. Assim como *Ngn1/2*, *mAsh1* também aumenta a expressão do ligante DELTA da via do Notch, induz a migração de células progenitoras no córtex de camundongos (Henke et al., 2009; Shimojo et al., 2011) e regula a expressão de GTPases reguladoras de citoesqueleto (Ge et al., 2006).

A migração radial de células recém-egressas do ciclo celular tem como consequência a formação de diferentes camadas celulares concêntricas no tubo neural. Estas camadas são determinadas através da progressão da diferenciação neural, sendo a mais interna composta por progenitores neurais em proliferação e a mais periférica por células diferenciadas. Este tipo de organização permite a segregação espacial de genes marcadores para etapas distintas da neurogênese, como por exemplo, a expressão de Notch em células progenitoras, localizadas na zona ventricular (Fig. 4); *Sox3* e *Ngn2*, em células recém-egressas do ciclo celular, nas zonas subventricular e intermediária, imediatamente mais externa ao domínio de expressão de Notch; *Brn2*, uma proteína da família POU de fatores de transcrição, é expressa desde a zona ventricular até a intermediária, sendo responsável pelo egresso do ciclo celular de progenitores neurais e pelo início da diferenciação neural e migração radial

(Castro et al., 2006; Tanaka et al., 2004). Outro exemplo é *NeuroD4/NeuroM*, uma proteína expressa na zona intermediária, em células pós-mitóticas e em início de diferenciação (Fig. 4).

E por último, há a expressão de *SCG10*, um marcador de diferenciação tardia, expresso por células localizadas na região mais periférica do tubo neural, chamada de zona do manto. *SCG10* codifica uma proteína associada à membrana, que se liga a cones de crescimento de neurônios em desenvolvimento, sendo sua presença relacionada à neuritogênese (Fig. 4; Stein et al., 1988).

Figura 4: **Hibridação *in situ* para marcadores conhecidos do desenvolvimento neural.** Na zona ventricular, onde estão localizadas células progenitoras, há a expressão de *Notch*, seguida da expressão de *Sox3* também na zona ventricular e subventricular. Já *Ngn2* e *NeuroM* são expressos na zona intermediária, onde há predomínio de células recém-egressas do ciclo celular e em início de diferenciação. Por último, sendo expresso na zona do manto e em gânglios da raiz dorsal, região de células diferenciadas, está *SCG10*. Adaptado de: Yan et al., 2012.

Além de *SCG10*, outros marcadores conhecidos são utilizados para caracterizar células em diferenciação e já diferenciadas, como a beta tubulina III, reconhecida pelo anticorpo Tuj1 (Lee et al., 1990; Lewis, Cowan, 1988; Menezes, Luskin, 1994) e o gene *Islet1*. A beta tubulina III é comumente expressa em células diferenciadas, sendo sua presença enriquecida nos axônios emitidos pelos motoneurônios localizados na zona do manto do tubo neural, raiz ventral e gânglios da raiz dorsal (Yan et al., 2012). Já *Islet1*, tem sua expressão em células pós-mitóticas em processo de diferenciação em motoneurônios (Ericson et al., 1992).

1.5 *cScrt2* – um fator de transcrição pós-mitótico

Dentre os genes expressos nos precursores pós-mitóticos, nós enfocaremos neste trabalho o *Scratch2* (*Scrt2*). Nos estágios iniciais do desenvolvimento, *Scrt2* é expresso nas células pós-mitóticas do tubo neural, numa população muito restrita da camada interna da zona intermediária (Fig. 5; Vieceli et al., 2013). *cScrt2* está ausente nas células positivas para BrdU e fosfohistona H3 da zona ventricular do tubo neural de galinha, e também na grande maioria das células que expressam marcadores de precursores neurais *Sox3* e *Ngn2* (Vieceli et al., 2003). Além disso, o domínio de expressão de *cScrt2* é complementar ao de

SCG10, um marcador neural de diferenciação tardia (Vieceli et al., 2013). Um padrão de expressão semelhante pode ser observado em embriões de peixes e camundongos, nos quais *Scrt2* é consistentemente associado à células progenitoras neurais que estão deixando a proliferação (Dam et al., 2011; Marín, Nieto, 2006).

Figura 5: **Expressão embrionária de *cScrt2*.** (A-E) Hibridação *in situ* em embriões inteiros, demonstrando a expressão de *cScrt2* nos estágios HH17 (em A e D), HH19 (em B e E) e HH23 (C). A linha tracejada em (C) indica o nível e plano de corte da imagem (F). (D) A seta indica células positivas no metencéfalo, enquanto a cabeça de seta indica células no placódio nasal. (E) Os números romanos indicam os gânglios craniais positivos para *cScrt2*. Em (F), corte transversal da região truncal da espinha dorsal (posição em C) demonstrando expressão de *cScrt2* em HH23. grd, gânglio da raiz dorsal. Adaptado de: Vieceli et al., 2013.

A presença de *cScrt2* na camada imediatamente externa à zona proliferativa sugere que a ativação da sua expressão pode ser controlada por fatores de transcrição presentes na região subventricular. As proteínas bHLH e POU, são fortes candidatos a reguladores a montante da expressão de *cScrt2*. Além de estarem presentes na região subventricular, desempenham importante papel na regulação dos passos iniciais da neurogênese, incluindo comprometimento neuronal, especificação de subtipo celular e egresso do ciclo celular. Os fatores proneurais bHLH, tais como *Ngn1*, *Ngn2* e *Ascl1/Ash1* podem formar heterodímeros com o fator de transcrição POU, *Brn2/POU3F2*, para regular, em conjunto, alguns genes-alvo do programa neurogênico. (Dominguez et al., 2013; Itoh et al., 2013). Além disso, similar ao *Scrt2*, eles também estão envolvidos na migração de neurônios pós-mitóticos (Fode et al., 2000; Ge et al., 2006). Finalmente, uma análise *in silico*

prévia identificou potenciais sítios de ligação para *Brn2/Ash1*, localizados a aproximadamente 13kb da região genômica codificante de *Scrt2* (Castro et al., 2006). Por fim, a expressão de *Scrt2* é induzida pela superexpressão dos fatores neurogênicos *mAsh1* e *NeuroD2* em células p19 (Nakakura et al., 2001). Juntos, esses dados fortemente sugerem que as proteínas bHLH e POU podem regular o início da expressão de *Scrt2*.

1.6 *Scratch2* no desenvolvimento neural

Trabalhos anteriores caracterizaram o fator de transcrição *Scrt2*, do tipo Zinc-finger, como um elemento relevante na diferenciação neural pós-mitótica inicial e na migração celular. Foi observado em *Drosophila*, que a perda de função de *Scrt* reduz o número de células fotorreceptoras nos olhos multifacetados de moscas adultas, embora não afete a morfogênese do sistema nervoso embrionário (Roark et al., 1995). Ainda de acordo com este estudo, moscas com *Scrt* sob o controle do promotor da proteína heat shock (HS-*Scrt*) tem a produção de neurônios extras durante a embriogênese e na neurogênese nos adultos após choque térmico. Isto pode ser devido, em parte, ao aparecimento precoce de células precursoras neurais. Em outro invertebrado, no nematodo *C. elegans*, foi visto que o homólogo de *Scrt*, *Ces-1* (Metzstein, Horvitz, 1999), está relacionado à inibição da apoptose de neurônios na região da faringe, provavelmente através da repressão de dois outros genes que atuam na morte celular, *ced-3* e *ced-4* (Ellis, Horvitz, 1991).

Em vertebrados, *Scrt2* está presente durante o desenvolvimento embrionário, no sistema nervoso central, como dito anteriormente, em células recém-egressas do ciclo celular, na zona intermediária do tubo neural e também do telencéfalo (Itoh et al., 2013; Marin, Nieto, 2006; Paul et al., 2012). Foi visto que, assim como em *Drosophila*, no teleósteo *Danio rerio* (Dam et al., 2011), *Scrt* está relacionado à prevenção da morte celular. A ligação de *Scrt2* em sítios E-box no íntron do gene *Puma*, envolvido na apoptose de células neurais, reprime sua expressão e consequentemente tem um efeito protetor contra a morte celular (Rodríguez-Aznar, Nieto, 2011). Contudo, a expressão de *Scrt2* em camundongos está associada a um novo papel, atuando no início da migração de células do neocortex e da zona subventricular do hipocampo, sendo estas últimas as responsáveis pela origem de células da glia. O *knockdown* de *Scrt2* retém células precursoras neurais na zona ventricular, interferindo na migração neural correta e, portanto, na formação das camadas corticais do telencéfalo

(Itoh et al., 2013; Paul et al., 2012), demonstrando sua importância na neurogênese. Por fim, a expressão de *Scrt2* é suficiente para induzir a neurodiferenciação em células P19 quando na presença de ácido retinóico (Nakakura et al., 2001).

1.7 Estrutura gênica codificante e disposição genômica

A família Scratch pertence à superfamília Snail/Slug de fatores de transcrição, juntamente a família Snail. A primeira possui os membros *Scratch1* e *Scratch2*, enquanto que a segunda possui os fatores *Snail1*, *Snail2/Slug* e *Snail3/Smuc* (Fig. 6; Barrallo-Gimeno, Nieto, 2005).

Todos os membros desta superfamília possuem a região C-terminal bem conservada, com 4 a 6 domínios *zinc-fingers*, que auxiliam na ligação da proteína na curvatura maior do DNA em sítios E-box (CAGGTG) (Nakakura et al., 2001; Nieto, 2002), que também são reconhecidos por fatores de transcrição bHLH (Nakakura et al., 2001). A outra extremidade, a região N-terminal, também é conservada, apresentando o domínio SNAG em vertebrados (Grimes et al., 1996; Nakakura et al., 2001), em *Snail1* de equinodermos e cefalocordados (Langeland et al., 1998) e em *Scratch* de *Drosophila* (Roark et al., 1995). Este domínio é necessário para que *Scrt* atue como repressor transcricional (Dam et al., 2011; Grimes et al., 1996). E ainda, o que diferencia a família Scratch das outras proteínas da família Snail é a presença do domínio conservado SCRATCH entre o domínio SNAG e *zinc-finger* (Fig. 6; Manzanares et al., 2001; Vieceli et al., 2013).

Figura 6: **Esquema da estrutura proteica dos membros da superfamília Snail/Slug.** Todos genes que compõem esta superfamília apresentam o domínio repressor SNAG na região N-terminal e na extremidade C-terminal, de 4 a 6 domínios zinc-finger de ligação ao DNA. Os domínios Scratch e Slug são os diferenciais entre as famílias Scratch e Snail, respectivamente, sendo o domínio Slug presente apenas em *Snail2*.

Em *Gallus*, *Scrt2* (NCBI, NP_001166993.1) está localizado no cromossomo 20, na posição 10263333 a 10264039. Este gene é composto por dois éxons e um íntron, codificando uma proteína final de 276 aminoácidos (NCBI, NP_001166993.1) (Fig. 7).

Figura 7: **Estrutura do gene *cScrt2*.** *Scratch2* em *Gallus* possui 2 éxons e 1 íntron. As barras amarelas representam as regiões UTR 5' e 3', respectivamente. Em azul estão o primeiro e segundo éxons e, em preto, o único íntron deste gene.

1.8 Regulação gênica

De forma resumida, existem duas formas conhecidas de regulação gênica, a transcricional e a pós-transcricional. Dentre os mecanismos de regulação transcricional, a estrutura da cromatina é o ponto de controle primário: a transição da heterocromatina compacta, transcripcionalmente silenciada para a eucromatina frouxa, transcripcionalmente ativa é determinada por complexos remodeladores de cromatina, isoladores e modificação pós-traducional de histonas (Shlyueva et al., 2014). As modificações pós-traducionais de histonas, incluem metilação, acetilação e ubiquitinação de resíduos de caudas de histonas associadas à cromatina (Rothbart, Strahl, 2014). Este mecanismo inicial de regulação está atrelado à metilação do DNA em ilhas CpG, sendo ambos, a metilação de histonas ou do DNA, fatores epigenéticos que regem a regulação gênica. A metilação do DNA, no entanto, é descrita, até então, como sendo um fator epigenético herdável em diversos organismos, diferentemente da metilação de histonas (Szyf, 2015). O padrão de metilação de ácidos nucléicos é reproduzido nas células-filhas através da DNA metiltransferase (DNMT; revisto em Yao, Jin, 2014). Muitas vezes, estes dois tipos de modificações, diretamente no DNA ou nas histonas, são confundidos como algo único, quando de fato são mecanismos dependentes e altamente inter-relacionados, porém distintos. Em outras palavras, o início da modificação do estado transcricional pode ser desencadeado através de metilações no DNA que guiam para as modificações de histonas, consequentemente alterando a estrutura da cromatina e, culminando no silenciamento ou ativação transcricional. Alternativamente, modificações nas histonas, como a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27Me3) (Levine et al., 2014), poderão refletir no padrão de metilação do DNA (Rose, Klose, 2014), acarretando na atração

de complexos inativadores de cromatina, o recrutamento de fatores que reconhecem ilhas CpG-metiladas e, conseqüentemente, no silenciamento gênico (Szyf, 2015).

Uma segunda etapa de controle na regulação transcricional, ocorre através da interação de fatores de transcrição com regiões genômicas *cis*-regulatórias. Elementos-*cis* são *motifs* de DNA genômico frequentemente localizados relativamente perto de um gene regulado, sendo também chamados de *enhancers*. Porém, a identificação de trechos genômicos genuinamente relevantes para a expressão gênica continua sendo um desafio. Recentemente, com a crescente disponibilização de genomas sequenciados em base de dados públicas, a análise comparativa genômica tem se comprovado como uma ferramenta poderosa para identificação de potenciais elementos *cis* (Betancur et al., 2010; Loots, Ovcharenko, 2007). O racional atrás desta metodologia é a conservação evolutiva de elementos não-codificantes que exercem funções relevantes no controle da expressão gênica. Da mesma forma que sequências codificantes, as sequências não-codificantes neutras tendem a divergir na sua sequência por não sofrerem pressões seletivas positivas. Em contrapartida, sequências regulatórias conservadas entre espécies filogeneticamente distantes sugerem uma importância no controle de expressão gênica.

Os elementos *cis*-regulatórios são reconhecidos por fatores de transcrição, também classicamente conhecidos como elementos-*trans*. Estes fatores reconhecem uma sequência nucleotídica e interagem com os elementos-*cis* que a possuem, atuando na ativação ou inibição da transcrição. De modo geral, os fatores de transcrição ativadores são modulares, e sua sequência proteica pode ser subdividida em domínio de ligação ao DNA, que reconhece e interage com os elementos *cis* do gene-alvo, e o domínio de ativação que interage com outras proteínas nucleares relevantes para estimular a transcrição. Os fatores de transcrição são frequentemente classificados de acordo com a homologia e conservação da sequência do domínio de ligação ao DNA. Dentre as várias classes de fatores de transcrição, as mais bem caracterizadas especificamente no contexto de desenvolvimento neural são as superfamílias de proteínas *zinc-fingers* (e.g. superfamília Snail), homeobox (e.g. *Engrailed*, *Pax6*), bHLH (e.g. *Ascl1/Ash1*, *Ngn1/2*) e POU (e.g. *Brn*).

1.9 miRNAs

Os mecanismos de regulação pós-transcricionais de expressão gênica incluem a regulação através de RNAs não codificantes, como *small interfering RNA* (também chamado de *silencing*, siRNA), *micro RNA* (miRNA), RNA longo não-codificante (*long ncRNA*), *piwi-interacting RNA* (piRNA) (Szyf, 2015) e *transcription initiation RNA* (tiRNA) (Taft et al., 2010). Foi visto que este último está associado à genes enriquecidos com marcações de resíduos de histonas, como metilação e acetilação de lisina, indicando sítios de transcrição ativa (Taft et al., 2010). Não foram encontradas associações de sítios com marcação para silenciamento de transcrição, como (H3K9ME2), sugerindo que os tiRNAs realmente estão relacionados à ativação da transcrição.

Especialmente os miRNAs, são uma família de pequenos RNAs fita simples não-codificantes, com aproximadamente de 21 a 26 nucleotídeos e que possuem função regulatória. Sua atividade envolve o silenciamento gênico pós-transcricional através de sua ligação na região 3'-UTR de mRNAs-alvo (An et al., 2014; Valencia-Sanchez et al., 2006). Inicialmente, os miRNAs são longos transcritos, chamados de miRNA primário (pri-miRNA) e logo são clivados por um complexo enzimático nuclear, o Drosha/DGCR8 (Zhao et al., 2010). Depois de seu transporte para o citoplasma através da proteína exportina 5, o pri-miRNA é processado para seu estado maduro, o miRNA, através da enzima Dicer. Ao final, para que sua função seja exercida, o miRNA é incorporado ao *RNA-induced silencing complex* (RISC) para atuar diretamente na repressão da tradução proteica (Zhao et al., 2010).

Vários estudos em diversos organismos, tem sido desenvolvidos acerca das vias e genes em que estas moléculas poderiam estar atuando, inclusive em galinhas (Darnell et al., 2006; Feng et al., 2014; Glazov et al., 2008; Rathjen et al., 2009). Nesse panorama, foi visto que a expressão do ligante da via Notch, *Dll1*, se sobrepõe ao dos miRNAs -103, -107 e -130, sugerindo que possam ser reguladores de *Dll1* no sistema nervoso central de camundongos (Hoesel et al., 2010). Ainda, *Pax6* e diversos outros fatores de transcrição envolvidos na neurogênese são alvos de miRNAs (Meza-Sosa et al., 2014). Como vários destes fatores são transcritos em um mesmo tecido e há, ao longo deste, uma especificação de subpopulações, esse controle poderia ser dado através da interação entre um gradiente de expressão dos fatores de transcrição e a regulação através dos miRNAs. É o caso do *Pax6*, onde o gradiente de expressão do miR-7 determina zonas específicas de diferenciação neural a partir da repressão em um gradiente de expressão oposto ao de *Pax6* (De Chevigny et al., 2012). Em

estudo recente realizado em *Danio rerio*, foi visto que *Scrt2* evita o reingresso de células neurais pós-mitóticas no ciclo celular ao se ligar ao promotor de miR-25, reprimindo sua expressão (Rodríguez-Aznar et al., 2013). A redução dos níveis de miR-25 permite a tradução de *p57*, uma proteína envolvida na inibição do ciclo celular (Rodríguez-Aznar et al., 2013).

Por fim, acreditamos que a geração de um padrão complexo de expressão como o de *Scrt2*, pode ser o resultado final de diversos elementos *cis* e *trans* atuando em conjunto (Atkinson, Halfon, 2014).

2 OBJETIVOS

Considerando a importância da precisão espaço-temporal da ativação e repressão gênica na progressão do desenvolvimento neural, nós nos propomos aqui a compreender melhor os mecanismos de regulação gênica de precursors neurais pós-mitóticos utilizando como paradigma experimental o gene *cScrt2*.

Especificamente, este trabalho teve por finalidade identificar e compreender o(s) mecanismo(s) envolvidos na regulação da expressão de *cScrt2* através dos seguintes objetivos específicos:

a) Verificação do efeito da superexpressão dos fatores *trans* a montante, *Ash1* e *Brn* na expressão endógena de *cScrt2*.

b) Identificação de elementos *cis*-regulatórios na região genômica de *cScrt2* e teste para confirmação da sua função biológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico*

A sequência genômica de *cScrt2* foi analisada para possíveis regiões *cis*-regulatórias através de uma busca *in silico* para regiões evolutivamente conservadas (*Evolutionary Conserved Regions* - ECR) na plataforma online *ECR Browser* (<http://rvista.dcode.org>), usando o genoma humano (hg19) como base (posição do homólogo de *Scrt2* no genoma humano: chr20:638594-660469). Alinhada a esta sequência-base, adicionamos os genomas de gambá (monDom5), rato (m4) e camundongo (mm10) para comparação evolutiva das sequências. Os parâmetros utilizados foram: ECR length, 350; ECR similarity, 77; Layer height, 55 e relative coordinate system). Nossa análise se restringiu a estes organismos, pois a região genômica de *Scrt2* em *Gallus* ainda não está totalmente sequenciada.

As sequências resultantes do *ECR Browser* foram, então, submetidas ao Consórcio ENCODE (*UCSC Genome Browser*, <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>), para verificação de sítios ricos para H3K4Me1, H3K4Me3 e H3K27Ac nas linhagens celulares GM12878 (*B-lymphocyte, lymphoblastoid*), H1-hESC (*Human Embryonic Stem Cells*), HSMM (*Human Skeletal Muscle Myoblasts*), HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), K562 (*Chronic myelogenous leukemia*), NHEK (*Human Epidermal Keratinocytes*) e NHLF (*Human Lung Fibroblasts*).

Assim, foi identificada uma ECR *cis*-regulatória com 80 pb (*intron80*) em uma das subregiões intrônicas analisadas (sequência senso 5'-TCTCCTGGAAATAACCTTGCTGCATGCTCGGAGGCAGCGTGAGAAATTGCTGAGCAGAGCGCTTTCTGCACAGCCCGTG-3'; antisenso 5'-CACGGGCTGTGCAGAAAGCGCTCTGCTCAGCAATTTCTCACGCTGCCTCCGAGCATGCAGCAAGGTTATTTCCAGGAGA-3'). Esta sequência está correlacionada com padrão de alterações de histona condizentes com região regulatórias. Por fim, todas as sequências resultantes inicialmente do *ECR Browser* e, posteriormente do Consórcio ENCODE (*intron80*) foram analisadas no algoritmo *P-match* (www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi) para a identificação de potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição cadastrados no banco de dados TRANSFAC 7.0. Para isto,

utilizamos os seguintes parâmetros: *group of matrices: vertebrates/high quality matrices only*; *Cut-off selection*, para reduzir falsos-positivos; *Predefined profile, nerve_system_specific*.

A análise *in silico* para miRNA foi realizada na plataforma online <http://www.mirbase.org> (*miRBase* 21, Junho de 2014) após identificação da região evolutivamente conservada (ECR) no *ECR Browser*. A sequência conservada é 5'-CCGACCGCCCGCAGTATTACTTGTAATGCAATTCAGGGATATAAAAGGGACTTCTGCCACT-3'. Os parâmetros utilizados foram os padrões para *Analysis by sequence*, com *E-value cutoff* = 50 e somente apresentando resultados para humanos e *Gallus gallus*.

3.2 Clonagem do *intron80*

A sequência intrônica de *cScrt2 (intron80)* foi sintetizada artificialmente pela empresa Exxtend (Exxtend, Campinas, SP, Brasil), com a inclusão dos sítios de restrição para as enzimas XhoI e KpnI (Fermentas, Waltham, MA, USA), localizados nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Em seguida, *intron80* foi inserido no plasmídeo pGEM-T (*pGEM-T Vector System*) (Promega, Fitchburg, WI, EUA – protocolo fornecido juntamente com o produto), sendo, posteriormente, digerido com as enzimas de restrição citadas anteriormente e subclonado no vetor-teste, pTKeGFP (fornecido pelo Dr. Hisato Kondoh, Universidade de Osaka, Japão), como demonstrado abaixo:

Digestão

Vetor ou plasmídeo com inserto	2 µg
Tampão 1 (1x)	2 µl
XhoI	1 µl
KpnI	1 µl
Água ultrapura	até 20 µl

Os reagentes descritos acima foram incubados em termociclador por 5 horas a 37 °C, obedecendo a temperatura de atividade das enzimas. Após isso, as extremidades do vetor linearizado foram desfosforiladas com fosfatase alcalina (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Fermentas), para evitar a circularização do vetor caso tenha sido digerido por

apenas uma das duas enzimas. No final deste processo, foi adicionada às amostras um corante, o azul de bromofenol 1:6 (*6x Dye*, Fermentas), para marcar a migração das moléculas no gel. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1 ou 2% (dependendo do tamanho do fragmento de interesse a ser observado) + brometo de etídio 1:20.000 em tampão TAE. Para determinação aproximada do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado um marcador de amostras (*1kb DNA Ladder*, Fermentas) ao lado dos produtos de digestão ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) durante a eletroforese. Em seguida, as bandas correspondentes aos produtos com tamanho desejado foram extraídas com um kit de extração de gel (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega). Na eluição final da purificação foi utilizado o volume mínimo de água recomendado pelo kit (25 µl), para maximizar a concentração de DNA na solução final.

No passo seguinte, no material proveniente da digestão e consequente purificação, foi realizada uma reação para ligação vetor (pTKeGFP) – inserto (*intron80*), como descrito abaixo:

Ligação

Tampão 10x	1 µl
Vetor digerido	300 ng
Inserto digerido	900 ng
T4 DNA Ligase	1 µl
Água ultrapura	até 10 µl

Após, as reações foram incubadas a 16 °C *overnight*. Em seguida, os produtos da reação foram utilizados para transformar bactérias, como descrito na próxima seção.

3.3 Transformação de bactérias e purificação

O DNA (vetor+inserto) e as bactérias (*E. coli*) foram descongelados em gelo e estas, então, foram ressuspensas e distribuídas em novos tubos. Foi adicionado o DNA à suspensão de bactérias, sendo o volume deste de até 10% do volume final (bactérias+DNA). A suspensão bacteriana com o DNA foi incubada por 20 minutos em gelo. Para introduzir o DNA nas bactérias, aplicamos um choque térmico de 37-42 °C por 2 minutos, seguido de imersão

em gelo. Após, adicionamos 1 mL de SOC sem antibiótico para que a bactéria transformada possa adquirir resistência ao antibiótico de seleção. Posteriormente, as bactérias foram colocadas no agitador a 37 °C por 1 hora.

Enquanto isso, foi preparado o meio LB-ágar (LB+0,7% ágar) para plaqueamento (25 mL/placa). Ao esfriar ao toque, adicionamos o antibiótico de seleção (varia de acordo com o plasmídeo transformado) e vertemos nas placas de Petri, evitando fazer bolhas. Passado o tempo necessário no agitador, centrifugamos as bactérias em 3500 rcf por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 100 µL de LB e inoculado nas placas prontas. Incubamos as placas invertidas em incubadora seca para crescimento das colônias.

No dia seguinte, confirmamos o sucesso da reação de ligação ou transformação por PCR de colônia, como demonstrado a seguir, e expandimos as colônias positivas *overnight* em meio LB+antibiótico para posterior estocagem, purificação do plasmídeo por mini/midiprep e/ou reação de sequenciamento.

PCR de colônias

Água ultrapura	9,25 µl
Tampão 10x	300 ng
dNTP	900 ng
MgCl ₂	1 µl
<i>Taq</i>	0,25 µl
<i>Primer F</i> 10 µM	2 µl
<i>Primer R</i> 10 µM	2 µl
TOTAL	18 µl por tubo

Foi adicionado a cada microtubo, 7 µl de água ultrapura aquecida. A colônia foi selecionada com uma ponteira e introduzida no microtubo com água. Após, misturamos as bactérias à água e deixamos em repouso por 10 minutos. Enquanto isso, preparamos a reação descrita acima. Em seguida, retiramos as ponteiras dos microtubos e adicionamos 18 µl do *mix* em cada microtubo, colocando no termociclador logo após.

Algumas colônias positivas foram cultivadas em amostras de 3 mL de LB com antibiótico, o DNA dessas culturas foi extraído com um kit de Miniprep (*PureLink HiPure*

Plasmid Miniprep) (Invitrogen, Waltham, MA, USA – protocolo de acordo com o fornecido juntamente ao produto) e uma outra porção foi estocada em 15% de glicerol em freezer -80°C.

3.4 Sequenciamento

A inserção do fragmento foi verificada por sequenciamento através do Serviço de Sequenciamento (SSDNA, Instituto de Química – USP/SP, Brasil).

Reação de Sequenciamento

DNA	~200ng
Primer (3,2 pmoles/ μ l)	3 μ l
5x sequencing buffer	3 μ l
BigDye v.3.1	2 μ l
DMSO	1,5 μ l
Água ultrapura	Até 15 μ l

A reação de sequenciamento descrita acima foi ressuspendida brevemente no vórtex e submetida ao seguinte programa no termociclador:

Programa do termociclador

1 – 96 °C	1 minuto
2 – 96 °C	45 segundos
3 – 50 °C (variável de acordo com o <i>primer</i>)	30 segundos
4 – 60 °C	4 minutos
5 – go to 2 por 35x	
5 – 4 °C	forever

Após a finalização dos ciclos no termociclador, foi adicionado às amostras os reagentes para precipitação da reação de sequenciamento: 21,81 μ l de 100% EtOH gelado + 1,59 μ l de NaOAc a 3 M, pH 5,2 + 1,59 μ l de glicogênio 1 mg/mL por amostra. A finalização do procedimento segue por incubação da reação em gelo por 15 minutos e centrifugação em temperatura ambiente por 30 minutos a 4000 rcf. Há, posteriormente o descarte do excesso

de reação e, novamente, uma centrifugação de um pulso, com tubo invertido, para completa remoção dos reagentes. Adicionamos 50 µl de etOH 70% gelado e repetimos a centrifugação por 20 minutos a 4000 rcf, seguido de uma breve centrifugação com tubos invertidos para retirada do excesso de reagentes.

Os arquivos resultantes do sequenciamento foram analisados nos softwares *Chromas Lite v2.1.1* e *UniPro UGENE v1.14.1* e confirmados por *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Uma vez confirmada a ligação da sequência intrônica no plasmídeo pTKeGFP (Castillo et al., 2010), o clone positivo selecionado foi cultivado em 100 mL de meio LB líquido e teve seu DNA extraído através de um kit de Midiprep baseado no processo de lise alcalina (*PureLink HiPure Plasmid Midiprep*, Invitrogen – protocolo de acordo com o fornecido juntamente ao produto).

3.5 Clonagem de *Ngn2* e *cSct2*

Para complementação da rede de interações gênicas que poderiam estar atuando nas etapas pós-mitóticas, realizamos em nosso laboratório a clonagem de alguns fatores, como a *Neurogenina 2 (Ngn2)* e *cScratch2 (cSct2)*.

Inicialmente, foi feita a extração de RNA total, em TRIzol (Invitrogen, protocolo de acordo com o fornecido pelo fabricante), da porção trunca de três embriões em estágio HH22-23 não-eletroporados (Hamburger, Hamilton, 1951). Após, foi realizada a síntese de cDNA, utilizando aproximadamente 1µg da amostra de RNA total e processado usando *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen), através do protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, processamos este material para amplificação através de PCR, seguindo o mesmo protocolo mencionado anteriormente, também fornecido pela Invitrogen. Os seguintes *primers* foram utilizados: para *Ngn2 forward* 5'-GAATTCGCGAGGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGCCGGTGAAGGCGGAGA e *reverse* 5'-GGATCCGGCCGCGTTAGAGGCA e para *cSct2 forward* 5'-GGAATTCGCCCATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGATGCCCCGCTCCTTCCTGGT e *reverse* 5'-GGGATCCCTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCGTTCCCTATTGCACAGCTGTG TTC. O *primer* senso de *Ngn2* possui sequência para marcação com FLAG e sítio para restrição

com a enzima EcoRI, enquanto o *primer* antissenso possui sítio para restrição como enzima BamHI. Nos *primers* para *cScrt2*, foram inseridas as sequências para as mesmas enzimas de restrição utilizadas nos *primers* para *Ngn2*, além da sequência para localização do peptídeo MYC.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, a banda correspondente purificada e o fragmento amplificado foi ligado ao plasmídeo pGEM-T, como descrito anteriormente. Para realização dos experimentos de superexpressão *in vivo*, o plasmídeo (pGEMT-*Ngn2*) foi submetido à digestão por enzimas de restrição (EcoRI e BamHI) e o fragmento subclonado no vetor pMES-IRES-GFP (Swartz et al., 2001), enquanto pGEMT-*Myc-cScrt2* foi subclonado no vetor pCIG-IRES-eGFP (Niwa et al., 1991).

Digestão

Vetor ou plasmídeo com inserto	2 µg
Tampão Tango (2x)	4 µl
EcoRI	1 µl
BamHI	1 µl
Água ultrapura	até 20 µl

Os reagentes descritos acima foram incubados em termociclador por 5 horas a 37 °C + 80 °C por 20 minutos, obedecendo a temperatura de atividade e inatividade das enzimas.

Os passos seguintes, referentes à eletroforese, purificação, ligação no vetor-teste, transformação, PCR de colônias, miniprep e sequenciamento foram descritos em sessões anteriores.

3.6 Clonagem de *cPax6*

O vetor contendo a sequência para *cPax6* (2000 pb, RCAS-*cPax6*, no. 15016) foi adquirido através da empresa Addgene (Addgene, Cambridge, MA, EUA) e clonado em nosso laboratório através de reação de amplificação (PCR) da sequência de interesse inserida no

vetor adquirido. Foram utilizados os seguintes *primers*: *cPax6-F* 5'-GAATTCGCCGCCATGCAGAACAGTCACAGCGGC; *cPax6-R* 5'-GGATCCTTACTGTAATCTTGGCCAATACTG. O *primer forward* possui sequência para restrição pela enzima EcoRI, enquanto o *reverse* possui para BamHI.

Os passos seguintes de clonagem (pGEM-T) e subclonagem (pMES-IRES-GFP) ocorreram de acordo com os protocolos descritos na sessão anterior.

3.7 Incubação e coleta de embriões de *Gallus gallus*

Os ovos utilizados nos experimentos *in vivo* são da raça White Leghorn e foram obtidos a partir de produtores de aves da região de São Paulo (Granja Yamaguishi, Jaguariúna, SP, Brasil), os quais possuem qualidade já testada pelo nosso laboratório. Estes foram incubados à temperatura de 37 °C e umidade do ar de 50% controladas para obtenção de embriões em estágio HH11-12, sendo estes necessários para início dos experimentos (Hamburger, Hamilton, 1951).

3.8 Eletroporação no embrião *in ovo*

Antes da abertura, a casca dos ovos foi limpa com etanol 70%. Em seguida, os ovos, um a um, tiveram sua albumina aspirada com o auxílio de uma seringa de 5 mL através de um orifício realizado no polo mais largo do ovo, seguido de vedação com fita adesiva. Com uma tesoura, abrimos uma janela oval na região superior da casca do ovo para aplicação da eletroporação no embrião. Com uma seringa de insulina (1 mL) em forma de gancho, injetamos nanquim estéril a 10% (diluído em solução salina de Howard Ringer), abaixo do embrião para contrastar e facilitar a visualização e estagiamento do mesmo.

Os plasmídeos pTKeGFP (controle – fornecido pelo Dr. Hisato Kondoh, Universidade de Osaka, Japão), pTKeGFP-*intron80* (3,5 µg/µl) (produzido como descrito anteriormente), pCAGGS-*mAsh1-IRES-GFP* (3,5 µg/µl; NM_008553.4) e pCAGGS-*mBrn-Eng-IRES-GFP* (3,5 µg/µl; NM_008899.2) (ambos fornecidos pelo Dr. Diogo Castro, Instituto Gulbenkian, Portugal) foram misturados com o plasmídeo pCMVLifeAct-TagRFP (Ibidi, Planegg, MU, Alemanha; Uchikawa, 2004; Riedl et al., 2008), o qual serviu como controle positivo da eletroporação, devido à sua expressão constitutiva (3,5 µg/µl), em uma proporção

de 1:1 e diluídos em *Fast Green* 0.2% (Sigma, St. Louis, MI, EUA). Após a microinjeção da mistura de plasmídeos na luz do tubo neural através do neuróporo posterior, os eletrodos foram posicionados paralelos ao tubo neural, estando o eletrodo positivo situado no lado direito do embrião. Após, aplicamos uma descarga elétrica, que atuou na desestabilização da membrana celular e na formação de poros, possibilitando a entrada do DNA para o interior das células. Somente a metade do tubo neural que esteve em contato com o eletrodo positivo deve apresentar expressão dos plasmídeos injetados. Assim, foram aplicados 5 pulsos de 20 V, com 30 ms de duração e 200 ms de intervalo entre eles. Após a eletroporação, os embriões foram reincubados para dar continuidade ao desenvolvimento e posterior análise e coleta em estágio HH22-23.

3.9 Imunohistoquímica

Os embriões tiveram a região trunca coletada, definida como a porção entre os brotos dos membros anteriores e posteriores, e fixados em 4% paraformaldeído em PBS por 20 minutos. Após, os embriões fixados foram lavados três vezes em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e crioprotetido em solução 1:1 de sacarose 20% + TissueTek OCT (Sakura, Alphen aan den Rijn, South Holland, Holanda) a 4 °C *overnight* para equilibrar o meio intracelular ao extracelular, crioprotetendo os tecidos no momento da inclusão dos embriões. No dia seguinte, os embriões foram embedidos nesta mesma solução e colocados em formas de inclusão para realização de cortes histológicos. Os criocortes de 12 µm de espessura, foram realizados em criostato (Leica, CM1850 UV), sendo coletados em lâminas gelatinizadas. Por fim, as lâminas com os criocortes foram congeladas e estocadas a -80 °C, sendo retiradas somente para realização de ensaio de imunohistoquímica.

Os criocortes foram descongelados e secos em estufa a 37 °C por 30-60 minutos, seguidos de fixação em paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após, as lâminas foram lavadas três vezes de 10 minutos com PBS e os cortes colocados em solução de bloqueio com NGS 3% (Normal Goat Serum, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído em PBST (PBS com 0,5% Triton X-100, Sigma) por 1hr em temperatura ambiente em câmara úmida. Este procedimento impede a ligação do anticorpo à epítomos inespecíficos. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio e incubado *overnight* em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados foram: rabbit anti-GFP IgG (diluição 1:200, Molecular Probes,

no. A-6455), mouse anti-HNK-1 IgM (Biomeda, V6044). No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido através da tripla lavagem das lâminas com PBS por 10 minutos cada, seguido da aplicação do anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente e em câmara úmida. Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa 488 goat anti-mouse IgM (diluição 1:200, Molecular Probes, no. A-21042), Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:200, Molecular Probes, no. A-11008), Alexa 647 donkey anti-rabbit IgG (diluição 1:800, no. A31573), Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:500, no. A11011). Por fim, as lâminas foram novamente lavadas em PBS por três vezes de 10 minutos, montadas em FluoroShield Mounting (com DAPI, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK) e analisadas em microscópio de fluorescência ou microscópio confocal (CEFAP, USP).

3.10 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

Para cada amostra (controle, eletroporações com pCAGGS-*mASH1*-IRES-GFP, pCAGGS-*mBrn-Eng*-IRES-GFP, pMES-*cNgn2*-IRES-GFP ou pMES-*cPax6*-IRES-GFP, a porção trunca de três embriões em estágio HH22-23 foi homogeneizada juntas em TRIzol (Invitrogen), e seu RNA foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA, foi utilizado aproximadamente 1,5 µg de cada amostra de RNA total e processado usando SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), através do protocolo fornecido pelo fabricante. Para a reação de qPCR, utilizamos Power SyBr Green (Applied Biosciences, Waltham, MA, EUA) e *primers* com concentração final de 400 nM.

qPCR

DNA	([] final de 25 ng) 5 µl
<i>Primers</i> (1600 nM)	5 µl
Power SyBr Green	10 µl

O programa foi realizado em 40 ciclos, com temperatura de amplificação de 63 °C. O programa e as sequências dos *primers* (Tabela 1) utilizados estão demonstradas a seguir.

Programa de amplificação

1 – 95 °C	10 minutos
2 – 95 °C	15 segundos
3 – 63 °C	1 minuto
5 – ir para passo 2	40x

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para RT-qPCR.

<i>Primer</i>	Sequência
<i>cAsh-F</i>	5'-TCAACTTCAGCGGCTTCG
<i>cAsh-R</i>	5'-AGGTTACACAGCTTGACTCG
<i>cNgn2-F</i>	5'-TGTCAGGGCTGAATGCAAGCGT
<i>cNgn2-R</i>	5'-ATGCATGAGGCGCTCCTCCCT
<i>cPax6-F</i>	5'-AGGATGCTGAACGGGCAGAC
<i>cPax6-R</i>	5'-CTGCCCCGGGTACCGAGGTG
<i>cScrt2-F</i>	5'-CTGCTGCAGGGCCACATGCGTTCGCACA
<i>cScrt2-R</i>	5'-GCACTGCTTGCACTTGTAGTGCTT
GAPDH-F	5'-CCGTGTTGTGGACTTGATGG
GAPDH-R	5'-GAGGAGTGGGGGAGACAGAA
<i>qBrn-F2</i>	5'-CCCTCGGCGCAGGAGATCA
<i>qBrn-R2</i>	5'-CCCGTACACGTCCTCGGCG

Os *primers* para GAPDH foram utilizados para detecção de expressão de proteína constitutiva, sendo um controle endógeno. Enquanto que a expressão de IRES foi utilizada como uma forma indireta de normalizar para extensão de células eletroporadas. Este ensaio foi realizado no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) acoplado ao software StepOne v2.3. Os dados exportados deste software foram analisados e os cálculos realizados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001) e desvio padrão no software Microsoft Office Excel 2013. Para a verificação de significância estatística, foi utilizado o método de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), com pós-teste pelo intervalo de confiança da mediana no software Graphpad Instat v3.10.

3.11 Hibridação *in situ*

Os experimentos de comparação de expressão por hibridação *in situ* foram realizados em embriões eletroporados e controles com 4 dias embrionários. O estágio embrionário da coleta depende do padrão de expressão temporal do gene endógeno avaliado. Os embriões foram coletados em PBS-DEPC (*Phosphate Buffered Saline-Diethylpyrocarbonate*) e fixados em paraformaldeído-DEPC 4% por 2 horas em temperatura ambiente ou a 4 °C *overnight*. Após, os embriões foram limpos, sendo removidas as membranas extraembrionárias e a porção cervico-cranial, deixando apenas a região truncal. Na sequência, os embriões foram lavados três vezes de 10 minutos cada em PBST-DEPC (PBS 1x + Tween 0,1%) e passaram por uma série de desidratação em metanol (PBST-DEPC + metanol 25%, 50% e 75%), sendo cada lavagem de 15 minutos e finalizando com duas lavagens de 10 minutos em metanol absoluto, sendo armazenados também em metanol absoluto. Os embriões foram, então, estocados em freezer -20 °C até a realização do ensaio de hibridação.

No primeiro dia do processo, os embriões foram reidratados em série de PBS-DEPC-metanol, permeabilizados com Triton X-100 (Sigma) 0,3% em PBS por 15 minutos e Proteinase K (Roche) 5 µg/mL em TE (Tris-EDTA) a 37 °C por 10-30 minutos. Em seguida, o material foi novamente fixado em PFA-DEPC 4% a 4 °C por 5 minutos e acetilado com anidrido acético 0,25% em trietanolamina 0,1 M por 10 minutos. A pré-hibridação foi realizada em formamida 50% + SSC 5x + Denhardt's 5x + RNAt de levedura 250 µg/mL + DNA de esperma de salmão 500 µg/mL por 20-24 horas. As ribossondas *cScrt2* senso e antisenso (JN982016) foram sintetizadas *in vitro* na presença de nucleotídeos marcados com DIG (digoxigenina-11-UTP; Life, Waltham, MA, EUA).

No segundo dia, a hibridação foi realizada utilizando a sonda diluída a 200-400 ng/mL em solução de pré-hibridação a 72 °C por 20-24 h e as lavagens pós-hibridação foram feitas com SSC 0,2x a 72 °C por duas vezes de 1 hora, no terceiro dia. O material foi, então, bloqueado com solução de bloqueio 1% (Boehringer Mannheim) em MAB (*Maleic Acid Buffer*) por 1 hora e incubado com anticorpo anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina (Roche, Grenzachstrasse, Basel, Suíça) 1:5000 em solução de bloqueio a 4 °C *overnight*.

No quarto e último dia, o sinal foi revelado com NBT-BCIP (*nitro blue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) diluído em NTMT (Tris pH 9,5 0,1M + NaCl 0,1M + MgCl₂ 50mM) por 4-6 horas em temperatura ambiente, no escuro. Lavamos por 3x de 5 minutos em PBST, no escuro. Após, os embriões são fixados em 4% paraformaldeído em PSB

por 2 horas em temperatura ambiente, ainda no escuro. Os embriões foram lavados por 3x de 10 minutos em PBST, no escuro. Para retirar o excesso de sonda e estocar os embriões, submetemos à desidratação em série de metanol 25%, 50% e 75% em PBST por 10 minutos cada. Após, lavamos em metanol 100% por 2x de 10 minutos. Para obtenção de imagens e inclusão, os embriões foram reidratados em série de metanol 75%, 50% e 25% em PBST por 10 minutos, seguido de 2x de 10 minutos em PBST. Os embriões, por fim, foram fotografados e seguiram para inclusão. Foram incubados por 4 horas em 5% sacarose em PBS a 4 °C, depois em sacarose 15% em PBS a 4 °C *overnight* e, por último, por 4 horas em gelatina + sacarose 20% a 37 °C. Os moldes tiveram o fundo coberto de gelatina e os embriões foram posicionados. Os moldes sofreram banho de nitrogênio líquido e estocados em freezer -80 °C. Os cortes transversais da região trunca com 25 µm de espessura foram coletados em lâminas SuperFrost Plus (Fisher Scientifics, Waltham, MA, EUA). Em seguida, as lâminas foram secas em estufa a 37 °C *overnight* e tiveram a gelatina removida por lavagem em PBST pré-aquecido a 37 °C por 10 minutos. Após, os cortes foram lavados em PBS por 2x de 3 minutos e desidratados em série de etanol 70%, 80%, 90% e 95% por 5 minutos cada. Por fim, foram lavadas em 2x de 5 minutos em 100% etanol, 2x de 5 minutos em xilol e montadas em Entellan.

As imagens dos cortes foram obtidas em microscopia de campo claro, enquanto que os embriões inteiros foram captados em estereomicroscópio (Nikon SMZ1500).

3.12 Imagens

Todas as imagens obtidas e figuras deste trabalho foram analisadas e produzidas no software Adobe Photoshop CS5 v12.0.4.

4 RESULTADOS

4.1 Elementos *Cis*

4.1.1 Análise *in silico* do íntron

A sequência genômica de *cScrt2* foi analisada para possíveis regiões *cis*-regulatórias que pudessem estar associadas com o controle de sua transcrição através de uma busca *in silico* para regiões evolutivamente conservadas (*Evolutionary Conserved Regions* - ECR) usando a plataforma pública online *ECR Browser* (Ovcharenko et al., 2004). Considerando que a sequência codificante de *Scrt2* é conservada e sua expressão restrita ao tubo neural em todos os vertebrados investigados até o momento, nós hipotetizamos que elementos genômicos relevantes, para sua expressão, também estariam evolutivamente conservados. Para tanto, alinhamos os genomas de gambá (monDom5), rato (m4) e camundongo (mm10) e utilizamos o genoma humano (hg19) como base genômica de comparação. O genoma de galinha disponível no banco de dados do *ECR browser* (versão *Galgal3*) está incompleto e não pôde ser utilizado para esta análise inicial. Nosso alinhamento revelou cinco ECRs, sendo uma delas na região 5'-UTR do primeiro éxon de *Scrt2*, com 1038 pb, e outras quatro na região intrônica, com 537 pb, 494 pb, 606 pb e 835 pb cada uma. Destas, a ECR altamente conservada com 494 pb na região intrônica de *Scrt2* presente nos três genomas de vertebrados comparados (Fig. 8A – retângulo azul-claro) foi posteriormente analisada em um software *online* oferecido pelo Consórcio *ENCODE* para seu potencial regulatório baseado em sequências genômicas associadas a modificações pós-traducionais na histona H3 (Qu, Fang, 2013). Regiões genômicas enriquecidas de histona 3 metiladas na lisina 4 (H3K4me1) estão classicamente relacionadas ao aumento da atividade transcricional, tendo sido aceitas como indicadores epigenéticos para potenciais sítios *enhancers* (Levine et al., 2014). Da mesma forma, a acetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27Ac) e trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) estão geralmente enriquecidas em regiões genômicas associadas à *enhancers* e promotores ativos, respectivamente (revisto em Boland et al., 2014). Uma vez que o Consórcio *ENCODE* abriga apenas informações sobre o genoma humano, fora utilizado então, o homólogo humano para a região intrônica identificada acima.

Os resultados sugerem que um fragmento de 80 pb inserido na sequência original de 494 pb estaria associado aos três marcadores da histona H3 mencionados acima

(Fig. 8 A' e A''), apontando, então, seu possível perfil regulatório. Em diante, nos referiremos a este fragmento como *intron80*. Após, verificamos através do BLAST que o *intron80* também está presente na sequência intrônica de *Scrt2* em *Gallus*, com 72,5% de conservação.

Figura 8: **Sequência intrônica de *cScrt2* como uma possível região regulatória.** (A) Análise comparativa entre o *Scrt2* genômico de gambá, rato e camundongo, demonstrando as Regiões Evolutivamente Conservadas (ECR, barras horizontais em rosa; seta preta). Os picos em amarelo representam as regiões UTR de *Scrt2*, os picos vermelhos são regiões intergênicas conservadas e, os picos em azul, são os éxons (também representados pelas barras horizontais). Os picos em salmão são regiões intrônicas conservadas. A área dentro da caixa em azul-claro indica a região intrônica conservada de 494 pb. (A') Esta região conservada (caixa em azul-claro) foi analisada na plataforma ENCODE (UCSC Genome Browser) para busca de um perfil regulatório. A legenda em cores indica as linhagens celulares nas quais foram analisados os perfis regulatórios desta região e (A'') uma sequência resultante de 80 pb (*intron80*) foi obtida. O *intron80* foi então clonado no plasmídeo pTK-eGFP para os ensaios *in vivo*.

4.1.2 Análise *in vivo*

Para testarmos se o *intron80* teria um papel *in vivo* na definição do padrão de expressão de *cScrt2*, o fragmento *intron80* foi inserido no plasmídeo pTK-eGFP para validação biológica da sua função regulatória (Fig. 8A''). Este plasmídeo possui um fraco promotor basal de timidina quinase, que necessita da adição de um *enhancer* para que eGFP seja expresso (Uchikawa et al., 2003). Para isto, embriões em estágio HH11-12 (Hamilton, Hamburger, 1951)

foram co-eletroporados com pTKeGFP-*intron80* + pCMVLifeAct-TagRFP na região posterior do tubo neural e analisados em HH22-23. LifeAct é um fragmento proveniente de uma proteína fúngica com 17 aminoácidos. A transcrição deste peptídeo inserido no plasmídeo pCMV é constitutiva e o produto protéico se liga à actina filamentar, marcando o citoesqueleto de actina através de sua fusão com a proteína fluorescente vermelha (RFP) (Riedl et al., 2008). Portanto, pCMVLifeAct-TagRFP serviu como controle positivo da qualidade da eletroporação. Caso *intron80* fosse realmente um elemento regulatório de *cScrt2*, esperávamos que a expressão de eGFP, situado no plasmídeo-teste e dirigida por *intron80*, se assemelharia ao padrão de expressão de *cScrt2* endógeno quando comparado com o lado contralateral (não eletroporado).

Para testar a sensibilidade do nosso ensaio, eletroporamos separadamente um controle positivo, o pTKeGFP-Sox10E1. Este plasmídeo possui como sequência-teste, um elemento regulatório de *Sox10* (Sox10E1) (Betancur et al., 2010). Esta sequência regula a expressão de *Sox10* no tubo neural e em células da crista neural desde a região cranial até a truncanal, a partir do estágio HH18. De fato, confirmamos os dados previamente publicados, em que Sox10E1 dirigiu a forte expressão de eGFP em todo o sistema nervoso central e também em células da crista neural e gânglios da raiz dorsal, ambos em HH18. Como tratava-se de uma sequência com atividade regulatória e atuação sobre a expressão de eGFP conhecidas, não foi necessária a co-eletroporação com um vetor controle. A expressão de eGFP dirigida por Sox10E1 era forte suficiente, dispensando a imunohistoquímica (dados não apresentados), e poderia ser visualizado apenas com a captação do sinal de GFP em estereomicroscópio de fluorescência. Desta forma, concluímos que o procedimento do nosso ensaio é sensível suficiente para detectar diferenças na expressão gênica conferidas por uma sequência-teste.

Verificamos que o *intron80* aumentou os níveis de expressão de eGFP em relação ao vetor controle (pTKeGFP sem inserto), e em algumas ocasiões, podendo ser vista sem o auxílio de imunomarcagem para eGFP no tubo neural posterior e cefálico (dados não apresentados), sugerindo que este fragmento tem uma atividade regulatória positiva. Contudo, ao contrário do esperado, a expressão de eGFP não simulou o padrão de expressão do *cScrt2* endógeno. A presença do *intron80* promoveu uma expressão irrestrita de eGFP no tubo neural posterior, e não se limitou a células recém-egressas do ciclo celular. Nós classificamos a expressão de eGFP a partir de uma avaliação qualitativa da mesma, graduando

de baixa a alta expressão (Fig. 9D-F'). Observamos também, que o padrão de expressão do plasmídeo controle para extensão e qualidade da eletroporação (pCMVLifeAct-TagRFP) não se assemelhou ao do vetor-teste, não se limitando somente ao tubo neural, mas sendo expresso ainda em células da crista neural, gânglios da raiz dorsal e no ramo da raiz ventral. Isto sugere, primeiramente, que apesar da eletroporação atingir elementos da crista neural, o *intron80* dirige apenas a expressão em células do tubo neural, incluindo regiões onde comumente *cScrt2* não é expresso, como nas placas do teto e do assoalho. Além disto, apesar de *intron80* ter uma função regulatória e ter desencadeado a expressão de eGFP no tubo neural posterior e cefálico, este fragmento não é suficiente para promover a expressão gênica de acordo com o padrão endógeno de *cScrt2*. Assim, de acordo com nossas observações, podemos ainda sugerir que *intron80* possa ser o cerne da regulação de *cScrt2*, mas para que sua expressão siga estritamente o padrão endógeno, talvez necessite da presença de outras regiões regulatórias adicionais (Fig. 11).

Nos chamou a atenção também a suposta atividade basal do pTKeGFP (plasmídeo sem inserto). Quando analisamos a expressão deste controle negativo após a eletroporação, avaliamos que a expressão basal gerada variava desde o nível de nenhuma expressão a expressão média (Fig. B-C'), sendo esta restrita somente à células do tubo neural (baixa) e também ao ramo da raiz ventral (neuritos de células do tubo neural; média expressão). Em contrapartida, os embriões eletroporados com pTKeGFP-*intron80*, variaram de baixa a alta expressão, sendo que a maioria das amostras apresentou níveis altos de expressão. Nestes embriões de alta expressão, observamos a expressão de eGFP no tubo neural, incluindo a placa do assoalho (Fig. 9F') e placa do teto, além do ramo da raiz ventral (dados não apresentados).

Figura 9: Co-electroporação de pTKeGFP-*intron80* e pCMVLifeActTagRFP no tubo neural truncal e avaliação qualitativa da expressão (AQ Expressão). Cortes transversais de tubos neurais em HH22-23, com eletroporações bem-sucedidas, foram identificadas para a presença de sinal fluorescente de RFP e processados para detecção de GFP por imunohistoquímica. (A) Tubo neural eletroporado com o controle positivo pTKeGFP-Sox10E1. Vê-se a expressão de GFP por imunohistoquímica no tubo neural (TN), nas células da crista neural (CCN; cabeças de setas), no gânglio da raiz dorsal (grd/GRD; linha branca tracejada) e no ramo da raiz ventral (rrv/RRV; linha amarela tracejada). Não foi realizada co-electroporação neste experimento. (n=4; Betancur et al., 2010). (B-C') Tubos neurais eletroporados com o vetor pTKeGFP para controle negativo. Qualificamos desde nenhuma a baixa (B e B') a média expressão (C e C'). (C') expressão de GFP no ramo da raiz ventral (rrv; entre as linhas amarelas tracejadas). (D-F') Eletroporações com pTKeGFP-*intron80*. Avaliamos desde baixa à alta expressão de GFP. (D e D') Na baixa expressão, encontramos GFP em poucas células, somente no tubo neural. (E e E') Para média expressão, além das células na região lateral do tubo neural, observamos expressão na placa do teto (pt/PT; retângulo branco tracejado). (F e F') Cortes apresentando alta expressão de GFP no TN, incluindo a placa do assoalho (pa/PA; cabeça de seta amarela).

A fim de confirmarmos que a expressão de eGFP dirigida por *intron80* é restrita ao tubo neural, realizamos uma dupla imunomarcação para células da crista neural através do anticorpo HNK-1 e para eGFP em criocortes de embriões eletroporados com pTKeGFP-*intron80* ou com o controle pTKeGFP. Quando comparado com o controle (pTKeGFP sem inserto), o qual não apresentou expressão (Fig. 10A-A''), os resultados para os embriões eletroporados com pTKeGFP-*intron80*, demonstraram que, de fato, a expressão de eGFP é dirigida por *intron80* (Fig. 10B-B''), e que esta se dá apenas no tubo neural, incluindo a placa do assoalho. Fora do tubo neural, observamos células HNK-1-positivas no gânglio da raiz dorsal, que é formado pela migração de células da crista neural (Fig. 10 A' e B'). Não observamos, entretanto, células GFP-positivas no gânglio da raiz dorsal em nenhum dos embriões eletroporados com pTKeGFP-*intron80*. Estes dados sugerem que a ação de *intron80* ser restrita ao tubo neural, mas a eletroporação é dirigida para este tecido e existiria a possibilidade de que o *intron80* promovesse a expressão gênica em outros tecidos. Para testar esta possibilidade, também foram realizadas eletroporações de pTKeGFP-*intron80* no mesoderma, especificamente nos somitos. Não foi visto sinal de eGFP equivalente ao do tubo neural, contudo, poucas células, quase não notáveis, foram observadas, assemelhando-se à expressão basal de pTKeGFP vista no tubo neural (dados não apresentados). Dessa forma, podemos sugerir que *intron80* é uma sequência que pode ter um papel na ativação da expressão de *cScrt2* no tubo neural, mas sem simular o padrão do *cScrt2* endógeno.

Figura 10: ***Intron80* não promove a expressão de GFP em células da crista neural. (A-B'')** Imunomarcacão para HNK-1 e GFP e detecção de sinal para RFP em tubos neurais eletroporados com pTKeGFP e pTKeGFP-*intron80*. Em **(A e B)** houve a detecção de sinal para RFP, **(A' e B')** imunomarcacão para HNK-1, demonstrando as células da crista neural que formaram o gânglio da raiz dorsal e ramo da raiz dorsal (grd; região demarcada pela linha amarela tracejada e cabeça de seta amarela, respectivamente) e em **(A'' e B'')**, a imunomarcacão para GFP. Em **(A'')**, nos embriões-controle, não houve expressão de GFP. O sinal observado tem níveis similares ao ruído de fundo. Já em **(B'')**, nos embriões eletroporados com pTKeGFP-*intron80*, observamos a expressão de GFP em regiões do tubo neural (cabeças de setas brancas e também na placa do assoalho (pa). A última coluna **(Merge)** é a sobreposição dos canais de **(A-A'')** e de **(B-B'')**. Todas as imagens foram geradas em microscópio confocal em aumento de 40x. A escala é de 20µm.

4.2 Elementos *Trans*

4.2.1 Análise *in silico* do íntron

Além de investigar por possíveis elementos *cis*-regulatórios na região genômica de *cScrt2*, também buscamos por outros ECRs potencialmente relevantes que contivessem possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição já conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento do tubo neural. Especificamente, focamos no *Brn*, *Ash1* e *Pax6*. Para essa análise, utilizamos a ferramenta *P-Match*, com o banco de dados público TRANSFAC 7.0. O algoritmo *P-match* localiza sítios de ligação para fatores de transcrição em sequências de DNA baseado em informações cumulativas sobre sítios de ligação para fatores de transcrição no *TRANScriptioN FACTor database* (TRANSFAC) em um perfil específico (por exemplo, sistema nervoso ou ciclo celular) (Chekmenev et al., 2005; Wingender, 2008). Esta análise revelou quatro ECRs adicionais com 1038 pb, 537 pb, 606 pb e 835 pb cada, contendo 44 sítios de ligação previstos para *Pax6* e 12 para *Brn2/Ash1* em todos os cinco ECRs encontrados no perfil específico de sistema nervoso (Fig. 11). Os fatores de transcrição *Brn2* e *Ash1* foram categorizados juntos, pois competem pelos mesmos sítios de ligação (Castro et al., 2006). Esses dados apoiam análises *in silico* previamente publicadas para regiões *cis*-regulatórias reconhecidas por *mAsh1* e *Brn2*, que indicaram *Scrt2* como um possível gene-alvo (Castro et al., 2006). Além disso, os campos de expressão de *mAsh1* e *Brn2* se sobrepõem parcialmente com o de *Scrt2* (Guillemot, Joyner, 1993; Tanaka et al., 2004). *Brn2* é expresso internamente ao *Scrt2* no tubo neural, sugerindo que a expressão *Brn2* poderia preceder a de *Scrt2* e ter uma possível posição a montante na cascata de diferenciação neural (Tanaka et al., 2004).

O *intron80* também continha diversos sítios de ligação *Pax6* e *Scrt2* é expresso em células radiais gliais da zona ventricular no neocórtex, juntamente com *Pax6* (Paul et al., 2012). Além disso, o knockout de *Pax6* abole a expressão de *Scrt2* no *pallium* dorsolateral do córtex de camundongos. Em conjunto, estes dados sugerem uma estreita relação entre esses fatores (Paul et al., 2012). Sítios de ligação para fatores de transcrição adicionais estão listados na tabela 2.

Tabela 2: **Análise do *intron80* para sítios de ligação para fatores de transcrição.** Potenciais sítios de ligação para FT identificados através de análise da região intrônica *intron80* no *P-match*. Os resultados apresentaram 20 sítios de ligação para diversos FT, como *Pbx-1*, *Pax6* e *Brn2*. FT, Fator(es) de Transcrição; Core d-score mede a similaridade entre a sequência de DNA inserida e um dado sítio para FT do banco de dados; Matrix score é um peso para a qualidade da combinação entre a sequência e a matriz de dados. Ambos scores variam de 0 a 1, onde 1 indica a combinação exata. Perfil usado: *nerve system specific*.

Matrix ID	Posição (Fita)	Core d-scored	Matrix score	Sequência	FT
V\$PBX1_01	1 (-)	0.911	0.842	tCTCCTgga	Pbx-1
V\$PAX6_01	6 (-)	0.897	0.902	tggaataaccTTGCTgcatg	Pax-6
V\$PBX1_01	7 (+)	1.000	0.886	ggaAATAAc	Pbx-1
V\$PAX6_01	8 (-)	0.807	0.863	gaaataaccttGCTGcatgct	Pax-6
V\$PBX1_01	9 (-)	0.829	0.828	aAATAAcct	Pbx-1
V\$SRY_01	9 (+)	0.936	0.942	AAATAAc	SRY
V\$PBX1_01	11 (+)	0.911	0.847	ataACCTTg	Pbx-1
V\$SRY_01	12 (-)	0.954	0.952	taACCTT	SRY
V\$SRY_01	13 (+)	0.949	0.923	AACCTtg	SRY
V\$PBX1_01	24 (+)	0.779	0.810	atgCTCGGa	Pbx-1
V\$PAX6_01	30 (+)	0.968	0.872	ggaggCAGCGtgagaaattgc	Pax-6
V\$SP1_01	31 (+)	0.991	0.955	gaGGCAGcgt	Sp1
V\$CREB_02	35 (-)	0.988	0.890	cagCGTGAgaaa	CREB
V\$BRN2_01	36 (+)	1.000	0.939	agcgtgaGAAATtgct	Brn-2
V\$PBX1_01	40 (-)	0.794	0.815	tGAGAAatt	Pbx-1
V\$SRY_01	44 (+)	0.936	0.939	AAATTgc	SRY
V\$CREB_02	47 (+)	0.988	0.931	ttgcTGAGCaga	CREB
V\$PBX1_01	53 (+)	0.913	0.859	agcAGAGCg	Pbx-1
V\$SRY_01	59 (-)	0.939	0.941	gcGCTTT	SRY
V\$SP1_01	68 (-)	1.000	0.951	gcaCAGCCcg	Sp1

Figura 11: **Análise *in silico* para sítios reconhecidos por fatores de transcrição específicos na região genômica de *cSrt2*.** Análise *in silico* realizada no *ECR Browser* para busca de ECRs adicionais na sequência genômica de *cSrt2* e sua varredura no programa *P-Match 1.0* para possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição. A análise encontrou mais 3 regiões conservadas na sequência intrônica de *Srt2* e 1 upstream da região 5'UTR. Cada uma das ECRs encontradas estão demarcadas por diferentes cores, demonstrando com detalhes a posição dos sítios de ligação em cada uma delas logo nas barras abaixo. Estes ECRs demonstraram 44 possíveis sítios de ligação para os fatores de transcrição *Pax6* e 12 para *Brn2/Ash1* (barras pretas verticais logo abaixo de cada ECR correspondente). A legenda de cores descreve os picos de conservação identificados no alinhamento genômico. O *intron80* corresponde à região delimitada em azul-claro (494pb).

4.2.2 Análise *in vivo*

Desta forma, investigamos se *Ash1* e *Brn2* realmente controlam a expressão *cScrt2*. Nós eletroporamos embriões com pCAGGS-IRES-*mAsh1*-GFP e pCAGGS-IRES-*mBrn-Eng*-GFP. O primeiro é uma construção completa de *Ash1* de camundongo, enquanto o segundo é uma proteína-fusão entre o domínio repressor do fator de transcrição *Engrailed* e o domínio de ligação à DNA da proteína POU *Brn* (Castro et al., 2006). Quando *mBrn-Eng* se ligasse aos seus genes-alvo, todos teriam sua expressão reprimida devido ao domínio repressor de *Engrailed*. No caso da superexpressão de *mAsh1*, esperávamos que a superexpressão aumentasse os efeitos do *cAsh1* endógeno e, por consequência, ativasse ou reprimisse *cScrt2* além dos níveis normais. Em contraste, se o *Brn* de fato reconhece os sítios de ligação previstos na região genômica de *cScrt2*, a superexpressão de *mBrn-Eng* deveria reduzir a expressão *cScrt2*. Como controle positivo para o efeito de *mBrn-Eng* incluímos avaliações dos níveis de *Ngn2*, pois este último já foi identificado como gene-alvo diretamente regulado por *Brn* (Dominguez et al., 2013).

Também foram eletroporadas as sequências completas de *cNgn2* (pMES-IRES-*cNgn2*-GFP). *Ngn2* tem um padrão de expressão que se sobrepõe parcialmente ao de *cScrt2* (Vieceli et al., 2013). Foi visto ainda, que a superexpressão de *Scrt2* em *Xenopus laevis*, leva à redução dos níveis de expressão de *Ngn2* (Paul et al., 2012). Estas características nos sugeriram então, que *Ngn2* poderia participar na regulação de *cScrt2*.

Como a análise *in silico* do *intron80* sugeriu que existem sítios para ligação de *Pax6*, este fator de transcrição também foi incluído em nossos experimentos de superexpressão. Além disso, já foi relatado que camundongos *knockout* para *Pax6* (*Sey/Sey*) não apresentam expressão de *Scrt2* no *pallium* dorsolateral (Paul et al., 2012). Portanto, também esperávamos que a superexpressão de *cPax6* exógeno acarretasse no aumento de *cScrt2*. Incluímos nas nossas análises amostras eletroporadas com *cPax6* (pMES-IRES-*cPax6*-GFP).

Por fim, também coletamos amostras em que *cScrt2* foi superexpresso para verificar seu efeito sobre os níveis de genes proneurais. Estas amostras foram eletroporadas com *cScrt2* (pCIG-IRES-*Myc-Scrt2*-GFP) e utilizamos como controle negativo um vetor vazio, pCIG, que codifica para o gene *GFP* apenas. Em resumo, para entendermos a dinâmica da interação entre os possíveis membros da cascata de regulação gênica a montante de *cScrt2*, realizamos a superexpressão de um dos seguintes genes *cNgn2*, *cPax6*, *mAsh1* e *mBrn-Eng* e,

posteriormente, quantificamos as alterações nos níveis de expressão dos outros genes envolvidos através de RT-qPCR. Os embriões foram processados para RT-qPCR quantitativo e também para hibridização *in situ* para detectar o mRNA de *cScrt2*.

4.2.2.1 RT-PCR quantitativo

Dentre nossos dados, não pudemos concluir sobre os efeitos gerados por *mBrn* na expressão de *cPax6*, *cAsh1* e *cScrt2* (Fig. 12A, B e E), devido à magnitude dos desvios padrão. Pelas mesmas razões, o efeito inibitório de *mBrn*, apesar de ter reduzido a expressão de *Ngn2* pela metade, não refletem o efeito robusto previamente relatado, embora indique *Ngn2* como possível alvo de *Brn* (Fig. 12C; Dominguez et al., 2013). Das amostras com superexpressão de *mAsh1*, houve o aumento na média dos níveis de *cScrt2*, que novamente não foram estatisticamente significantes (Fig. 12E). Reciprocamente, não pudemos avaliar seu efeito sobre *cPax6*, *cNgn2* e *cBrn* (Fig. 12A, C e D).

Claramente, os dados obtidos de quadruplicatas biológicas apresentavam um desvio muito alto em relação à média. Em contraste, as triplicatas experimentais geraram números bastante consistentes internamente. Interpretamos que a magnitude do desvio padrão é consequência da quantificação de genes raros. Isto é, pouco expressos e restritos à uma pequena população de células como é o caso dos genes proneurais. Sobreposto a raridade dos genes proneurais, nossos experimentos tem o agravante adicional da heterogeneidade da eletroporação, que não atinge todas as células do tubo neural. Numa tentativa de reduzir a heterogeneidade gerada pela eletroporação e a variação dos valores obtidos, tentamos normalizar os ΔCt obtidos através da quantificação da transcrição de IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*). As eletroporações foram realizadas com plasmídeos pMES-IRES-GFP ou pCAGGS-IRES-GFP (também conhecido como pCIG), que contém num transcrito bicistrônico o gene de interesse e a sequência codificante do GFP. Portanto, tentamos utilizar os níveis de IRES eletroporados, como valor normalizador exógeno nos nossos cálculos. Em outras palavras, realizamos a eletroporação de embriões com o plasmídeo pMES-IRES-GFP vazio, e usamos o ΔCt de IRES para normalização nos cálculos do $\Delta\Delta Ct$ (Jiwaji et al., 2010). Contudo, os dados não apresentaram um efeito satisfatório. Talvez devido à heterogeneidade da eletroporação, em que a superexpressão dos genes por eletroporação não atinge todas as células do tubo neural, este método acarretou em um alto desvio padrão e aumento excessivo

da média das amostras, não conferindo um valor biológico real e, portanto, sendo inconclusivos.

Neste contexto de valores com alto índice de variabilidade, nos surpreendemos com o aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de expressão de *Ngn2* em amostras com superexpressão de *cScrt2* (Fig. 12C e F), contrapondo trabalho anterior que não apresentou diferença na expressão de *Ngn2* quando *Scrt2* foi superexpresso em cultura primária de células neocorticais ou na presença de células *Ngn2*⁺ na zona ventricular em testes *in vivo* (Itoh et al., 2013). Assim, pela primeira vez, estaríamos relatando um suposto efeito ativador de *cScrt2*, o qual foi descrito, até então, por ser principalmente como detentor de função repressora. O único exemplo previamente relatado de efeito de ativação de transcrição por *Scrt* foi em nematodos (Reece-Hoyes, 2009). Alternativamente, *cScrt2* pode estar reprimindo um elemento repressor de *Ngn2*, resultando no aumento indireto de *Ngn2*. Não observamos efeitos significativos de *cScrt2* sobre *cPax6*, *cBrn* e *cAsh1* (Fig. 12A, D e B).

Figura 12: Gráficos demonstrativos de alteração dos níveis de expressão através de RT-qPCR. Quantificação de (A) *cPax6*, (B) *cAsh1*, (C) *cNgn2*, (D) *cBrn* e (E) *cScrt2* em relação ao gene endógeno GAPDH nos embriões controle não-eletroporados (NE, barra azul-claro); eletroporados na região truncal do tubo neural com *cScrt2* (barra laranja); *cPax6* (barra cinza); *cNgn2* (barra amarela); *mAsh1* (barra azul-escuro) e para *mBrn-Eng* (barra verde). Embriões eletroporados com *cScrt2*, apresentaram aumento significativo (F, $p < 0,05$) na expressão de *cNgn2* (* em C).

4.2.2.2 Hibridação *in situ*

Por não termos obtidos resultados conclusivos através do qPCR sobre a regulação da expressão de *cScrt2*, visualizamos por hibridação *in situ* os efeitos obtidos através da superexpressão de *cPax6*, *cNgn2*, *cAsh1*, e *mBrn-Eng* sobre *cScrt2*. De acordo com a quantificação de *cScrt2* através de qPCR, apesar do alto desvio padrão das nossas amostras (Fig. 12E), esperávamos ver um aumento de *cScrt2* nas amostras de *cNgn2* e *mAsh1*. Os embriões eletroporados com *mAsh1* e *cNgn2* não demonstraram, inicialmente, nenhuma

diferença macroscópica na expressão de *cScrt2* entre os lados experimental eletroporado e controle do tubo neural (Fig. 13D e E) e também quando comparado com os embriões controle não eletroporado (Fig. 13A) e com eletroporação de vetor vazio (pCIG) (Fig. 13B). Contudo, após a realização de cortes transversais do tubo neural truncal, observamos um leve aumento no nível de expressão de *cScrt2* em embriões eletroporados com *mAsh1*, mas não foi observada nenhuma expansão no domínio de expressão (Fig. 13 D' e E').

Quando analisamos os embriões eletroporados com *cPax6*, esperávamos observar um aumento nos níveis de expressão de *cScrt2*, devido aos dados já publicados referentes a *cScrt2* ser um alvo *cPax6* (Paul et al., 2012). Para nossa surpresa, ao contrário do que os dados da literatura mencionam, observamos, macroscopicamente, uma leve redução da expressão de *cScrt2* nos embriões superexpressos com *cPax6* (Fig. 13C). Nos cortes realizados no tubo neural truncal, também foi verificada esta redução de expressão de *cScrt2*, mais precisamente na região mediana do tubo neural, local de expressão endógena de *cPax6* (Fig. 13C'). Quanto aos embriões eletroporados com *mBrn-Eng*, esperávamos que, *Brn* tendo sítios de ligação na região genômica de *cScrt2*, o *Brn* endógeno atuaria na regulação positiva da expressão *cScrt2*. Assim, a superexpressão de *mBrn-Eng* deveria diminuir a expressão *cScrt2*. Neste mesmo contexto, observamos no embrião inteiro (Fig. 13F e 1), que *mBrn-Eng* também reduziu os níveis de expressão de *cScrt2*, mas de uma forma mais severa que o efeito obtido em embriões eletroporados com *cPax6* (Fig. 13F''). Isto sugere que *Brn* está de fato envolvido na regulação de *cScrt2*. Contudo, não podemos afirmar, apesar dos sítios de ligação localizados na região genômica de *cScrt2*, se a redução nos seus níveis de expressão foi ocasionada pela ligação direta de *mBrn-Eng* a *cScrt2* ou se foi através da inibição de algum outro fator que ativaria a transcrição de *cScrt2*.

Figura 13: **Panorama dos efeitos visualizados, pós-eletroporação, sobre os níveis de expressão de *cScrt2*.**

Para cada um dos fatores e controle eletroporados, fizemos hibridação *in situ* em embriões HH22-23 inteiros para marcação de *cScrt2*. De **(A)** a **(1)**, os embriões inteiros estão dispostos em visão dorsal, com a região cefálica voltada para a extremidade superior das imagens. Todos os embriões **(B-1)**, tem o lado direito eletroporado. Em **(B-B')** observamos que o vetor vazio, pCIG (controle negativo), não foi capaz de alterar a expressão de *cScrt2* quando comparado com o lado contralateral, não-eletroporado, e com o embrião selvagem **(A-A')**. Em **(D-E)**, não são observadas alterações macroscópicas nos níveis de expressão de *cScrt2*. Contudo, em **(D'-E')**, pode-se observar um sutil aumento no lado eletroporado provocado pela superexpressão de pCAGGS-IRES-*mAsh1*-GFP e pMES-IRES-*cNgn2*-GFP, respectivamente. Em **(C)**, observamos uma leve redução de *cScrt2* na região eletroporada com pMES-IRES-*cPax6*-GFP (colchete branco). Em **(C')**, o corte transvesal apresentou redução da expressão de *cScrt2* na área que compreende a expressão de *cPax6* endógeno (região entre as linhas brancas tracejadas). Em **(F)**, *mBrn-Eng* foi capaz de reduzir a expressão de *cScrt2* no tubo neural truncal. **(1)** demonstra um aumento da região **(F)** eletroporada com pCAGGS-IRES-*mBrn-Eng*-GFP e a área com redução da expressão de *cScrt2* (colchete branco). **(F')** representa um corte acima da área eletroporada, onde não há efeito de *mBrn-Eng* sobre *cScrt2*, sendo o padrão de expressão de *cScrt2* no lado eletroporado semelhante ao lado contralateral. Já **(F'')** demonstra um corte transversal da área eletroporada, com redução da expressão de *cScrt2*, restando somente células mais periféricas do tubo neural (cabeças de seta pretas). Cortes em aumento de 20x. As linhas pretas tracejadas indicam o nível dos cortes de **(A'-F'')**.

4.3 Outros elementos regulatórios - Análise *in silico* para miRNAs

Como os miRNAs contribuem para a regulação de processos celulares através da sua capacidade de alterar a expressão gênica tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional, nos questionamos quanto à contribuição destas moléculas na repressão da expressão de *cScrt2* em células localizadas em camadas mais externas do tubo neural. Nós observamos um ECR localizado próximo à região 3'-UTR de *Scrt2* (Fig. 14) e comparamos a sequência dessa região anotada para galinhas (*Gallus*, NC_006107.3, posição de 10264040 a 10266139) com o genoma humano através da plataforma *BLAST* (RefSeq RNA; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figura 14: ECR com a possível sequência para miRNAs. A caixa vermelha indica uma ECR localizada na sequência 3' da região 3'-UTR de *Scrt2* no ECR Browser. A sequência em vermelho, com 61 pb, é o resultado do alinhamento conservado após a sequência 3'-UTR ser analisada no *BLAST* contra humanos.

Os resultados apresentaram uma sequência de 61 pb (Fig. 14 – em vermelho) com 89% de conservação entre galinhas e humanos. Esse fragmento foi, então analisado na plataforma *miRBase Database 21* (Griffiths-Jones et al., 2006), para miRNAs candidatos, que pudessem estar regulando *cScrt2*. Foram encontrados 8 sequências de miRNAs, sendo 6 delas específicas para humanos e duas para galinha (Tabela 3). Apenas uma dessas sequências (miR-16-1-3p) é comum a ambos os genomas, além de ser expressa no cérebro (Meunier et al., 2013), sugerindo uma possível função regulatória na expressão de *cScrt2*.

Tabela 3: **Análise *in silico* para miRNAs.** O processamento na plataforma *miRBase 21* resultou em 8 miRNAs encontrados na sequência conservada de 61 pb, sendo 6 deles específicos para humanos e 2 para galinha. A coluna “Score” indica a significância da combinação entre a sequência inserida e o miRNA encontrado, enquanto que o “E-value” é a significância estatística do “Score”. Um valor baixo de “e-value” indica uma combinação mais significativa. Os miRNAs em **negrito** são expressos tanto no genoma de humanos quanto no de galinhas.

ID	Início da seq.	Fim da seq.	Fita	Score	E-value	Organismo
hsa-miR-8069	1	13	-	56	23	Humano
hsa-miR-16-1-3p	12	29	+	54	33	Humano
hsa-miR-4509	31	48	+	54	33	Humano
hsa-miR-4697-3p	46	61	+	53	40	Humano
hsa-miR-211-3p	34	49	+	53	40	Humano
hsa-miR-6080	3	16	-	52	49	Humano
gga-miR-7469-5p	21	33	+	56	23	Galinha
gga-miR-16-1-3p	12	29	+	54	33	Galinha

5 DISCUSSÃO

A regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento neural é regida por vários fatores que interagem numa sequência complexa para gerar padrões de expressão temporo-especialmente específicos. Aqui, relatamos nossos resultados sobre potenciais sítios genômicos e fatores de transcrição que determinam a expressão pós-mitótica de *cScrt2* no tubo neural. Especificamente, identificamos *in silico* um potencial sítio *cis*-regulatório na região conservada do íntron de *cScrt2*. Nossas análises funcionais se concentraram nesta região e nos possíveis fatores de transcrição que a reconhecem. Os dados aqui relatados sugerem que *intron80* possa ser um *enhancer* no tubo neural posterior (Fig. 9D-F') e anterior (dados não apresentados), não sendo, do contrário, no gânglio da raiz dorsal (dados não apresentados). Apesar da sua expressão no tubo neural, *intron80* não apresentou restrição à subdomínios celulares, não sendo suficientemente robusto e específico de células pós-mitóticas. Uma possível explicação é que *intron80* tenha um comportamento mais complexo em relação à fase de desenvolvimento, podendo ser um controlador de *cScrt2* temporalmente específico. Para abordar esta possibilidade, seria necessário testar seu efeito em várias fases do desenvolvimento, desde HH17 até 30 (estágios de expressão de *cScrt2*) para verificar se esse padrão de expressão em todo o tubo neural se mantém ou se altera, dependendo da fase do desenvolvimento. Alternativamente, talvez o *intron80* necessite de interações com outras regiões regulatórias, como por exemplo, as outras regiões conservadas encontradas. Estas regiões também podem ter uma possível função regulatória uma vez que todas apresentam potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição neurais.

Nossas análises *in silico* revelaram também que o *intron80* contém potenciais sítios de reconhecimento para *Pax6* e *Brn/Ash1* (Fig. 11). Além disto, nossos resultados de hibridação *in situ* confirmam que a superexpressão de *cPax6* reduz levemente a expressão de *cScrt2*. Em conjunto, estes dados sugerem que *Pax6* regula a expressão de *cScrt2* negativamente. Contudo, esta conclusão se contrapõe a relatos anteriores sobre a relação de *Scrt2* com *Pax6* (Paul et al., 2012). No trabalho publicado por Paul e colaboradores, foi relatado que camundongos *knockout* para *Pax6* (*Sey/Sey*) tem expressão reduzida de *Scrt2* na região dorso-lateral cortical. Aqui, observamos a redução de *cScrt2* quando *cPax6* foi superexpresso. Da mesma forma, quando *Scrt2* foi superexpresso em embriões de *Xenopus*

laevis a expressão de *Ngn2* foi reduzida (Paul et al., 2012) e aqui observamos um leve aumento nos níveis de expressão de *cScrt2* quando eletroporado com *cNgn2*.

Existem várias possíveis explicações para os contrastes entre nosso trabalho e o de Paul e colaboradores. A primeira é referente ao local de expressão em que *Scrt2* foi investigado. No estudo anterior, a redução de *Scrt2* na ausência de *Pax6* se deu no córtex do sistema nervoso anterior, enquanto que aqui, a redução de *cScrt2* quando *cPax6* foi superexpresso foi detectada no tubo neural posterior. Apesar de *cScrt2* também ser expresso em células pós-mitóticas no neocórtex do embrião de galinha (comunicação pessoal)¹, os mecanismos que regem a expressão de *cScrt2* no tubo neural anterior podem ser significativamente diferentes do tubo neural posterior. Ou seja, pode haver uma diferença espacial na expressão de fatores de transcrição e/ou na atividade de outros mecanismos regulatórios que atuam na transcrição de *cScrt2* em diferentes regiões de um mesmo tecido. Um exemplo bem documentado de controle transcricional por elementos regulatórios espaço-temporalmente distintos é o gene *Pax6*. A transcrição de *Pax6* é regida por três promotores diferentes, caracterizando sua expressão no olho embrionário e/ou no tubo neural (Anderson et al., 2002). Em embriões de camudongo de 10,5 dias, a expressão de *Pax6* no tubo neural posterior é controlada especificamente por apenas um destes promotores, enquanto que os demais coordenam a transcrição no tubo neural anterior. Mais tarde, em embriões de 15,5 dias, todos os três promotores estão ativos no telencéfalo para a expressão de *Pax6* (Anderson et al., 2002).

Desta forma, o estágio de desenvolvimento no qual as análises experimentais foram realizadas, também pode determinar resultados distintos. Por exemplo, a expressão do gene neural *Sox10* é regido por dois elementos regulatórios distintos, E1 e E2, que são expressos em fases e regiões diferentes de um mesmo tecido no decorrer do desenvolvimento, controlando a expressão de *Sox10* no tubo neural e em células da crista neural (Betancur et al., 2010). O *enhancer* E1 controla a expressão de *Sox10* a partir do estágio HH15 no tubo neural vagal, enquanto que o elemento E2, controla *Sox10* no sistema nervoso cefálico, a partir de HH8. No nosso caso, as análises foram realizadas em embriões de galinha em estágio HH22-23, enquanto que as análises de Paul e colaboradores (2012) foram realizadas em camudongos no estágio E15,5, que correspondem a HH29-30 em galinhas (*Carnegie Stage Comparison*). Assim, possivelmente, a discrepância nas observações pode ser causada pela diferença de estágio embrionário na coleta de amostras entre nosso

¹ Informação fornecida por Felipe Vieceli em laboratório, 2013

grupo e de Paul e colaboradores. Caso isto seja verdade, pode ser indicativo de uma evolução temporal dos mecanismos regulatórios endógenos de expressão de *Scrt2*.

As nossas análises *in silico* revelaram também outro conjunto de fatores de transcrição com potencial regulatório sobre *Scrt2*: *Ash1*, um fator de transcrição do tipo bHLH e *Brn*, um fator de transcrição do tipo POU. Na validação *in vivo*, a expressão ectópica de *mAsh1* levou a um ligeiro aumento na expressão de *cScrt2* nas hibridações *in situ*. Porém, o efeito mais surpreendente foi a expressão da proteína quimérica *mBrn-Eng*. Esta quimera, que deveria reprimir a expressão de todos os genes-alvo de *Brn* aboliu a expressão de *cScrt2* nos experimentos de hibridação *in situ* (Fig. 13F).

Evidências apontam para sobreposição considerável de funções entre *cScrt2* e *Brn* no desenvolvimento neural. Ambas remoções de *Brn1/2* e redução da expressão de *Scrt2* interferem significativamente na migração neural (Dominguez et al., 2013; Itoh et al., 2013). Enquanto *Brn1/2* controlam a iniciação da migração radial através da regulação positiva da expressão de subunidades regulatórias de *Cdk5*, *Scrt2* inicia a migração celular através da redução de expressão de E-caderina (Itoh et al., 2013; McEvilly et al., 2002). Consistente com seu papel na iniciação da migração celular após a saída do ciclo celular, tanto *Brn* quanto *Scrt2* são expressos em células pós-mitóticas (Hagino-Yamagishi et al., 1997; Vieceli et al., 2013). Considerando nossos dados aqui apresentados, e também que *Brn2* é expresso desde a zona ventricular até a intermediária, e que *cScrt2* é expresso apenas na zona intermediária, é possível que *Brn2* não controle a expressão de *cScrt2* diretamente. Ao invés disso, visto que a expressão de *Brn2* precede a de *cScrt2*, a expressão *cScrt2* pode ser regulada indiretamente por *Brn2*. Em outras palavras, é possível que exista um elemento intermediário na cascata gênica, entre *mBrn-Eng* e *cScrt2*. Um possível candidato é *Ngn2*. *Brn* inibe diretamente a expressão de *Ngn2* através de seus elementos *cis*-regulatórios (Dominguez et al., 2013). Por sua vez, de acordo com nossos dados, *cScrt2* induz a expressão de *cNgn2*. Foi visto também que *Ngn2* induz a expressão de *Scrt2* em células neocorticais (Itoh et al., 2013). Neste contexto, podemos sugerir que há algum tipo de interação de feedback positivo. Assim, nossos resultados de repressão de *Scrt2* por *mBrn-Eng* poderiam ser explicados com uma via indireta, em que a superexpressão de *mBrn-Eng* teria reduzido a expressão de *Ngn2* que seria necessário para a transcrição de *cScrt2* (Fig. 15). Alternativamente, *mBrn-Eng* pode ter reprimido *cScrt2* diretamente – através de um dos elementos *cis*-regulatórios que identificamos – numa via paralela a de *Ngn2* (Fig. 15, via tracejada em azul).

Uma consideração adicional acerca dos mecanismos de ação de *Ash/Brn*, é a possibilidade de que estes fatores não estejam reconhecendo o íntron, mas um ou mais outros sítios mapeados na região não-codificante através da nossa análise *in silico*. Vale ressaltar que existem quatro ECRs adicionais, sendo três na região intrônica e um upstream da extremidade 5'-UTR. Nessas ECRs, quando somados, existem 44 sítios de ligação previstos para *Pax6* e 12 para *Brn2/Ash1* (Fig. 11). Além dessas, já foi relatada também uma outra região localizada a aproximadamente 13kb upstream ao gene *Scrt2*, com sequências de reconhecimento e ligação de *Brn1/2* e *mAsh1* (Castro et al., 2006) e que ainda não teve sua função regulatória biologicamente testada. Um possível experimento para determinar se o controle é direto via interação com sequências contidas no íntron, seria co-eletroporar células com o *Brn* e/ou *Ash* e com o *intron80* inserido num plasmídeo para ensaio de luciferase.

Figura 15: **Modelo da rede de interações obtida envolvendo *cScrt2* e padrão de expressão dos genes envolvidos.** (A) Esquema de cortes transversais do tubo neural em HH22-23, demonstrando o padrão de expressão dos genes envolvidos no nosso paradigma. No corte de cima está *cAsh1* (lilás), *cPax6* (amarelo) e *cNgn2* (rosa com tracejado branco). No corte abaixo deste, está o padrão de *cBrn* (azul-claro, zona ventricular até intermediária) e *cScrt2* (laranja). (B) Corte transversal de tubo neural em HH22-23 demonstrando a sobreposição de todos os padrões de expressão mencionados em (A). (C) Rede de interações obtida através dos nossos dados. As vias em preto são oriundas da hibridação *in situ*, as em cinza, do qPCR. A via de inibição de *Ngn2* por *cBrn* (em azul) refere-se à publicação de Dominguez e colaboradores (2013), enquanto a via azul tracejada indica uma possibilidade de *Brn* inibir *cScrt2* diretamente. A ativação de *cScrt2* por *cNgn2* (seta vermelha), refere-se à publicação de Itoh e colaboradores (2014).

Por último, gostaríamos de fazer algumas considerações sobre a aplicação de qPCR na avaliação de variações de expressão de genes raros. Originalmente pensávamos que o qPCR seria um ensaio mais sensível, permitindo a detecção mais acurada das variações. Contudo, ao nos depararmos com a grande variabilidade de resposta nos nossos ensaios, concluímos que a quantificação da variação de expressão de fatores de transcrição é

dificultada pelo padrão de expressão restritos dos mesmos. Os genes que avaliamos são todos fatores de transcrição neurais presentes em uma subpopulação celular do tubo neural, o que significa que os níveis endógenos dos genes avaliados na condição controle são baixos. Além disto, temos como agravante que o método de eletroporação não tem penetrância tecidual completa, com distribuição do plasmídeo de interesse em mosaico. Em consequência, qualquer efeito do gene superexpresso será também em apenas uma subpopulação de células do tubo neural. Finalmente, como existe muita homologia entre os membros da mesma subfamília de fatores de transcrição, como os membros da família POU, não conseguimos distinguí-los apenas com oligonucleotídeos de PCR. Acreditamos que todas as razões acima dificultaram nossas análises, sugerindo que o qPCR não é o método ideal para avaliação de variação de expressão de transcritos raros.

6 CONCLUSÃO

1) A região genômica de *cScrt2* possui cinco ECRs.

2) Uma dessas regiões, *intron80*, desencadeou a expressão de *eGFP* em nossos experimentos *in vivo*, caracterizando sua função regulatória.

3) *Intron80* não é um fragmento que simula o padrão de expressão de *cScrt2* endógeno, apesar de expressar *eGFP* no tubo neural.

4) As cinco ECRs possuem possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição, como *Ash1*, *Pax6* e *Brn2*.

5) A superexpressão de *mAsh1* levou ao aumento da expressão *cScrt2*, enquanto que *cPax6* reduziu a expressão de *cScrt2* na região de expressão de *cPax6* endógeno.

6) A forma repressora de *mBrn*, *mBrn-Eng*, reduziu significativamente a expressão de *cScrt2* no tubo neural.

REFERÊNCIAS*

- An J, Cai T, Che H, Yu T, Cao Z, Liu X, Zhao F, Jing J, Shen X, Liu M, Du K, Chen J e Luo W. The changes of miRNA expression in rat hippocampus following chronic lead exposure. *Toxicology Letters*. 2014;158–66.
- Anderson T, Hedlund E e Carpenter E. Differential Pax6 promoter activity and transcript expression during forebrain development. *Mech Dev*. 2002;114:171-5.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD e Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284:770-6.
- Atkinson TJ e Halfon MS. Regulation of gene expression in the genomic context. *Comp and Struc Biotech J*. 2014;9(13):1-9.
- Barrallo-Gimeno A e Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and câncer. *Development*. 2005;132(14):3151-61.
- Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J e Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol*. 2000;2:84–9.
- Bertrand N, Castro DS e Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci*. 2002;3:517–30.
- Betancur P, Bronner-Fraser M e Sauka-Spengler T. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *PNAS*. 2010;107(8):3570–5.
- Boland MJ, Nazor KL e Loring JF. Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. *Circ Res*. 2014;115:311–24.
- Casarosa S, Fode C e Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*. 1999;126(3):525-34.
- Castillo HA, Cravo RM, Azambuja AP, Simões-Costa MS, Sura-Trueba S, Gonzalez J, Slonimsky E, Almeida K, Abreu JG, de Almeida MAA, Sobreira TP, de Oliveira SHP, de Oliveira PSL, Signore IA, Colombo A, Concha ML, Spengler TS, Bronner-Fraser M, Nobrega M, Rosenthal N e Xavier-Neto J. Insights into the organization of dorsal spinal cord pathways from an evolutionarily conserved *raldh2* intronic enhancer. *Development*. 2010;137:507-18.
- Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, Johnston C, Drechsel D, Lebel-Potter M, Garcia LG, Hunt C, Dolle D, Bithell A, Ettwiller L, Buckley N e Guillemot F. A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev*. 2011;25: 930–45.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 jul. 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Castro DS, Skowronska-Krawczyk D, Armant O, Donaldson IJ, Parras C, Hunt C, Critchley JA, Nguyen L, Gossler A, Göttgens B, Matter JM e Guillemot F. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell*. 2006;11(6):831-44.

Chekmenev DS, Haid C e Kel AE. P-Match: Transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:W432-7.

Dam TMT, Kim HT, Moon HY, Hwang KS, Jeong YM, You KH, Lee JS e Kim CH. Neuron-specific expression of scratch genes during early zebrafish development. *Mol Cells*. 2011;31:471-5.

Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Konieczka JK, Yatskievych TA e Antin PB. MicroRNA Expression During Chick Embryo Development. *Developmental Dynamics*. 2006;235:3156-65.

De Chevigny A, Coré N, Follert P, Gaudin M, Barbry P, Béclin C e Cremer H. miR-7, a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci*. 2012;15:1120-6.

Diez Del Corral R e Storey KG. Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:835-9.

Dominguez MH, Ayoub AE e Rakic P. POU-III Transcription Factors (Brn1, Brn2, and Oct6) Influence Neurogenesis, Molecular Identity, and Migratory Destination of Upper-Layer Cells of the Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*. 2013;23(11):2632-43.

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

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

Feng YP, Chen JF, Huang P, Wang X, Wang J, Peng XL e Gong YZ. Expression analysis of differentially expressed miRNAs in male and female chicken embryos. *Genet. Mol. Res*. 2014;13(2):3060-8.

Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ e Guillemot F. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev*. 2000;14:67-80.

Gammill LS e Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(10):795-805.

Ge W, He F, Kim KJ, Bianchi B, Coskun V, Nguyen L, Wu X, Zhao J, Heng JI, Martinowich K, Tao J, Wu H, Castro DS, Sobeih MM, Corfas G, Gleeson JG, Greenberg ME, Guillemot F e Sun YE. Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *PNAS*. 2006;103:1319-24.

Glazov EA, Cottee PA, Barris WC, Moore RJ, Dalrymple BP e Tizard ML. A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Research*. 2008;18:957–64.

Gohlke JM, Armant O, Parham FM, Smith MV, Zimmer C, Castro DS, Nguyen L, Parker JS, Gradwohl G, Portier CJ e Guillemot F. Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development. *BMC Biol*. 2008;6:15.

Götz M e Huttner WB. The Cell Biology of Neurogenesis. *Nat Mol Cell Biol*. 2005;6:777-88.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A e Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006;34:D140–4.

Grimes HL, CHAN TO, ZWEIDLER-MCKAY PA, TONG B e TSICHLIS PN. The Gfi-1 Proto-Oncoprotein Contains a Novel Transcriptional Repressor Domain, SNAG, and Inhibits G1 Arrest Induced by Interleukin-2 Withdrawal. *Molecular and Cellular Biology*. 1996:6263–72.

Guillemot F. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development*. 2007;134(21):3771-80.

Guillemot F e Joyner AL. Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mechanisms of development*. 1993;42(3):171–85.

Hagino-Yamagishi K, Saijoh Y, Ikeda M, Ichikawa M, Minamikawa-Tachino R e Hamada H. Predominant expression of Brn-2 in the postmitotic neurons of the developing mouse neocortex. *Brain Res*. 1997;752:261–8.

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

Henke RM, Remetigh DM, Borromeo MD, Savage TK, Johnson JE. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev Biol*. 2009;328(2):529-40.

Hoesel B, Bhujabal Z, Przemeck GKH, Kurz-Drexler A, Weisenhorn DMV, de Angelis MH e Beckers J. Combination of in silico and in situ hybridisation approaches to identify potential Dll1 associated miRNAs during mouse embryogenesis. *Gene Expression Patterns*. 2010;10: 265–73.

Itoh Y, Moriyama Y, Hasegawa T, Endo TA, Toyoda T e Gotoh Y. Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition–like mechanism. *Nat Neurosci*. 2013;4:16-425.

Jiwaji M, Daly R, Pansare K, McLean P, Yang J, Kolch W e Pitt AR. The Renilla luciferase gene as a reference gene for normalization of gene expression in transiently transfected cells. *Molecular Biology*. 2010;11:103.

Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H e Imayoshi I. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat. Neurosci.* 2008;11:1247–51.

Lacomme M, Liaubet L, Pituello F e Bel-Vialara S. NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology.* 2012;32(13):2596–607.

Langeland JA, Tomsa JM, Jackman WR Jr e Kimmel CB. An amphioxus *snail* gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev. Genes Evol.* 1998;208:569–77.

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

Levine M, Cattoglio C e Tijan R. Looping Back to Leap Forward: Transcription Enters a New Era. *Cell.* 2014;157:13-25.

Lewis AS e Cowan NJ. Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells. *J Cell Biol.* 1988;106(6):2023-33.

Livak KJ e Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Loots G e Ovcharenko I. ECRbase: database of evolutionary conserved regions, promoters, and transcription factor binding sites in vertebrate genomes. *Bioinformatics.* 2007;23(1):122-4.

Louvi A e Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7:93-102.

Madarász E. Diversity of Neural Stem/Progenitor Populations: Varieties by Age, Regional Origin and Environment. *Neural Stem Cells - New Perspectives.* 2013;3:45-72.

Manzanares M, Locascio A e Nieto MA. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet.* 2001;17:178–81.

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

Mattar P, Britz O, Johannes C, Nieto M, Ma L, Rebeyka A, Klenin N, Polleux F, Guillemot F e Schuurmans C. A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev. Biol.* 2004;273:373–89.

Mcevilley RJ, de Diaz MO, Schonemann MD, Hooshmand F e Rosenfeld MG. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science.* 2002;295:1528–32.

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

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

Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, Liechti A, Weier M, Guschanski K, Hu H, Khaitovich P e Kaessmann H. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Research.* 2013;23: 34–45.

Meza-Sosa KF, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(175):1-13.

Nakakura EK, Watkins DN, Sriuranpong V, Borges MW, Nelkin BD e Ball DW. Mammalian Scratch participates in neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *Molecular brain research.* 2001;95(1-2):162–6.

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

Niwa H, Yamamura K e Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991;108:193-200.

Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG e Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res.* 2004;1(32):W280-6.

Paul V, Tonchev AB, Henningfeld KA, Pavlakis E, Rust B, Pieler T e Stoykova A. Scratch2 Modulates Neurogenesis and Cell Migration Through Antagonism of bHLH Proteins in the Developing Neocortex. *Cerebral cortex.* Epub 2012 Nov 23;DOI:10.1093/cercor/bhs356.

Perez SE, Rebelo S e Anderson DJ. Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Development.* 1999;126:1715-28.

Qu H e Fang X. A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* 2013;11(3):135–41.

Rathjen T, Pais H, Sweetman D, Moulton V, Munsterberg A e Dalmay T. High throughput sequencing of microRNAs in chicken somites. *FEBS Letters.* 2009;583:1422–6.

Reece-Hoyes JS, Deplancke B, Barrasa MI, Hatzold J, Smit RB, Arda HE, Pope PA, Gaudet J, Conradt B e Walhout AJ. The *C. elegans* Snail homolog CES-1 can activate gene expression in vivo and share targets with bHLH transcription factors. *Nucleic acids research.* 2009;37(11):3689–98.

Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-soldner R, Klopferspitz A, Avenue P e Francisco S. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods*. 2008;5(7):605–7.

Roark M, Sturtevant MA, Emery J, Vaessin H, Grell E e Bier E. *Scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to *snail*, promotes neuronal development. *Genes & Development*. 1995;9:2384-98.

Rodríguez-Aznar E e Nieto MA. Repression of Puma by scratch2 is required for neuronal survival during embryonic development. *Cell death and differentiation*. 2011;18(7):1196–207.

Rodríguez-Aznar E, Barrallo-Gimeno A e Nieto MA. Scratch2 prevents cell cycle re-entry by repressing miR-25 in postmitotic primary neurons. *J. Neurosci*. 2013;33(12):5095–105.

Rose NR e Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1839:1362–72.

Rothbart SB e Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1839:627–43.

Shimojo H, Ohtsuka T e Kageyama R. Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Front in Neurosc – Neurogenesis*. 2011;5(78):1-7.

Shitamukai A e Matsuzaki F. Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Develop. Growth Differ*. 2012;54:277–86.

Shlyueva D, Stampfel G e Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Gen* 2014;15:272-86.

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

Szyf M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends Mol Med*. 2015;2:134-44.

Taft RJ, Simons C, Nahkuri S, Oey H, Korbie DJ, Mercer TR, Holst J, Ritchie W, Wong JJ-L, Rasko JEJ, Rokhsar DS, Degnan BM e Mattick JS. Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. *Nat Struct & Mol Biol*. 2010;17(8):1030-5.

Talikka M, Perez SE e Zimmerman K. Distinct patterns of downstream target activation are specified by the helix-loop-helix domain of proneural basic helix-loop-helix transcription factors. *Dev Biol*. 2002;247(1):137-48.

Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N e Kondoh H. Interplay of SOX and POU Factors in Regulation of the Nestin Gene in Neural Primordial Cells. *Molec and Cell Biol.* 2004;24:8834–46.

Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y e Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell.* 2003;4:509–19.

Uchikawa M, Takemoto T, Kamachi Y e Kondoh H. Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mech. Dev.* 2004;121:1145–58.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ e Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development.* 2006;20:515–24.

Vieceli FM, Simões-Costa M, Turri JA, Kanno, T e Bronner-Fraser M e Yan CYI. The transcription factor chicken Scratch2 is expressed in a subset of early postmitotic neural progenitors. *Gene Expr Patterns.* 2013;13(5-6):189–96.

Wingender E. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Briefings in Bioinformatics.* 2008;9(4):326-32.

Yan CYI, Vieceli FM, Kanno TK, Turri JAO e Hayashi MAF. Gene Expression in Embryonic Neural Development and Stem Cell Differentiation in Embryogenesis. ISBN 978-953-51-0466-7. 2012:249-68.

Yao B e Jin P. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. *Genes and Development.* 2014;28:1253-71.

Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang TN, Xu X, Mi Q-S, Xin M, Wang F, Appel B e Lu QR. MicroRNA-Mediated Control of Oligodendrocyte Differentiation. *Neuron.* 2010;65:612–26.