MARAYSA DE OLIVEIRA MELO

O papel do complexo PAR durante a embriogênese
do placóide do cristalino

Tese 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 Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

MARAYSA DE OLIVEIRA MELO

O papel do complexo PAR durante a embriogênese
do placóide do cristalino

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan

Versão corrigida. Versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

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

Melo, Maraysa de Oliveira.

O papel do complexo PAR durante a embriogênese do placóide do cristalino / Maraysa de Oliveira Melo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan.

Tese (Doutorado) – 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: Mecanismos moleculares da morfogênese do cristalino em vertebrados.

Versão do título para o inglês: The role of PAR complex during lens placode embryogenesis.

1. Actina 2. Embrião de galinha 3. Placóide do cristalino 4. Polarização celular 5. Proteínas PAR 6. Embriogênese 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/SBIB096/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maraysa de Oliveira Melo.

Título da Tese: O papel do complexo PAR durante a embriogênese do
placóide do cristalino.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

Profa. Dra. ANA PAULA LÉPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, William e Domingas, e aos meus irmãos, William e Thaysa, por todo incentivo, amor e apoio constante durante minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa Dra Chao Yun Irene Yan, pela confiança, pelo empenho em me ensinar a ser uma grande pesquisadora e pelas oportunidades que me trouxeram crescimento pessoal e profissional. Obrigada por me dar a oportunidade de discutir sobre ciência através dos JCs e por discutir os meus próprios resultados, pelas críticas e pelos “puxões de orelha”, que me permitiram amadurecer. Foi um prazer fazer parte da equipe do laboratório. Obrigada por me incentivar a dar uma boa aula, por me ensinar várias técnicas e por tornar a biologia do desenvolvimento mais interessante. Posso dizer hoje que quase tudo que sou como cientista eu devo à professora Irene.

Agradeço ao grande amigo, Ricardo Moraes Borges, que me ensinou tudo de bancada, que parava tudo o que estava fazendo para me ajudar, pelo carinho e pelas discussões sobre ciência. Ficar do lado dele era um aprendizado constante. Obrigada pela amizade de sempre.

Ao pessoal do laboratório pela amizade e companheirismo e por fazer do ambiente um lugar agradável para se frequentar. Ao Felipe Monteleone Vieceli, pela ajuda com biologia molecular e pela paciência para ensinar. A Tatiane Yumi Nakamura Kanno, pela companhia de sempre, pela amizade e pelas incansáveis discussões sobre nossos projetos que muitas vezes me ajudaram a encontrar a solução para os problemas. À Carolina Goes Purcell, pelas incansáveis risadas, por participar das “artes” no laboratório comigo e pela companhia. Aos ICs que passaram pelo laboratório, em especial ao Edgar Ruz e a Cecília Magalhães, com quem tive a oportunidade de trabalhar, co-orientar e criar meu próprio jeito de orientar; e a Mariana Fogo (Sagaz e minha protegida) e a Juliana Borsoi Sant’Ana, que se tornaram grandes amigas e irmãs mais novas. E ao Marco Aurélio Amadeu, pela ajuda técnica e por sempre tentar me ajudar a resolver os problemas de experimentos quando me via aflita.

Ao grande amigo, Adam Arai Martens, por sempre estar presente nos momentos felizes e tristes, pela sinceridade, pela confiança, pelos almoços e cafés, pela torcida, pelo incentivo, pelas risadas e pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

À grande amiga, Paola Branco, que abriu sua casa e sua vida para que eu pudesse fazer parte, que sempre me mostrou o lado bom dos momentos ruins e que sempre soube me acalmar nem que fosse apenas com um abraço ou uma palavra de carinho.

Aos amigos da Pós-graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela ajuda com experimentos, pelas conversas no corredor e pela torcida.

À Maíra, por me ajudar com as análises dos filopódios, pelo carinho quando eu mais precisei, pelo incentivo e pela amizade.

À Marley Januário da Silva, por trazer alegria todos os dias, pela amizade, pelos abraços fortes e sem fim, pelas pizzas na casa dela e pelas palavras sempre positivas.

Ao pessoal do laboratório do Professor Anselmo, que era uma extensão do nosso laboratório, e que sempre ajudaram em tudo o que podiam.

Aos professores da Pós-graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e aos professores de outros departamentos, pela ajuda com equipamentos, reagentes e pelas discussões sobre pesquisa; em especial gostaria de agradecer ao Dr. Anselmo Sigari Moriscot, à Dra. Deborah Schechtman, à Dra. Edna Teruko Kimura, ao Dr. Emer Suavino Ferro, à Dra. Marinilce Fagundes dos Santos, pelas conversas, e ao Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger, pelos elogios que me incentivaram muito.

Ao professor Shankar Srinivas, por me receber em seu laboratório em Oxford, por me ensinar com muita sabedoria a fazer grandes imagens. Ao pessoal do laboratório, Antônio Miranda, Sharon Ruane, Chris, Matthew Stower e Karolis Leonavicius por me receberem tão bem e por me ajudarem em tudo o que eu precisei.

Às meninas que moraram comigo, Tatiane Y. N. Kanno, Marília Estevam, Flávia Esperança de Oliveira e Camila Fernandes Moro, com quem dividi meu espaço e que foram minha família aqui em São Paulo.

Aos amigos de Alfenas, Jacqueline Mazzuchelli, Cintia Scucuglia e Rodolpho Rodrigues, pelos encontros, apoio e pela amizade que continua forte até hoje mesmo com a distância.

À Natalia Carvalho, minha irmãzinha do coração, com quem eu posso contar sempre, pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo, por sempre se preocupar com a minha felicidade.

À família Karia, Claudio Takao Karia, Soraia Real Karia e Juliana Yumi Real Karia, por terem me acolhido como membro da família; o que vocês fizeram e fazem por mim só meus pais fariam. Obrigada pelo apoio de sempre.

Ao meu namorado, Bruno Takao Real Karia, pelo companheirismo, pelo amor, pela preocupação comigo, pelas inúmeras vezes que me ajudou e que aguentou meu estresse, obrigada por me mostrar que as decisões que precisamos tomar na vida são mais simples do que parecem e que somos nós que complicamos tudo. Você é muito especial e importante para mim.

À minha família querida, por estar sempre do meu lado; ao meu pai, William Luiz de Melo, por todo o empenho, pelas coisas que deixou de fazer para que eu estudasse, pelas noites sem dormir, pela preocupação e pelo amor que sempre demonstrou e que me mantém forte. À minha mãe querida, Domingas F. C. de Oliveira Melo, por sempre batalhar para que pudéssemos estudar, pelo amor, carinho e atenção que nos deu sempre, pelos conselhos, por sempre acalmar meu coração com palavras boas e incentivadoras e por ser sempre meu porto seguro.

Aos meus irmãos queridos, Thaysa de Oliveira Melo e William Luiz de Melo Filho pela torcida de sempre, por sempre dizerem que vai dar tudo certo, pelo amor, pelo carinho, pela união, pela amizade, por aguentar meu estresse e pela presença constante na minha vida. Amo muito vocês.

À Regina Cássia Valbom, o Mario Costa Cruz e o Roberto Cabado Modia Junior pela atenção e ajuda. E a todos que direta ou indiretamente ajudaram durante a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2009/08203-2) pelo auxílio financeiro.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embriologia Molecular de Vertebrados do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo: 2009/08203-2).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King

RESUMO

Melo MO. O papel do complexo PAR durante a embriogênese do placóide do cristalino [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O cristalino origina-se de um epitélio simples e cuboidal que recobre a vesícula óptica evaginada do tubo neural, chamado de ectoderma pré-placoidal. A região basal desse ectoderma pré-placoidal está voltada para a vesícula óptica e a região apical está exposta ao ambiente extraembrionário. Nesse estágio, os filamentos de actina estão distribuídos ao longo do eixo apico-basal. Após o contato com a vesícula óptica, o ectoderma pré-placoidal sofre intensas mudanças que incluem aumento da altura e rearranjo para formar o placóide do cristalino, um tecido pseudoestratificado. Uma das mudanças mais expressivas que ocorrem é o acúmulo de uma rede de actina na região apical que é importante para a constrição apical durante a invaginação do placóide do cristalino. As características dessa rede de actina é restrita à região do placóide e claramente segue a orientação da polaridade que é particular dessa região. As proteínas PAR têm sido constantemente associadas com eventos de polarização e o efeito da segregação das proteínas PAR é importante para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular. Neste trabalho, nós propusemos estudar a função das proteínas de polarização do complexo PAR com enfoque na função da proteína de polarização PAR3 e sua fosforilação durante o estabelecimento da rede apical de actina. Para analisar o papel das proteínas PAR durante o alongamento do placóide do cristalino em embriões de galinha, o ectoderma pré-placoidal (HH9-10) foi eletroporado, com plasmídeos contendo a sequência das proteínas PAR de interesse, e analisados em estágio de placóide (HH13). Os cortes histológicos dos embriões eletroporados foram submetidos à marcação para actina e imunofluorescência para identificar as células eletroporadas. Foi visto que a superexpressão de PAR3 induz a formação de pontos ectópicos de actina na membrana baso-lateral do placóide do cristalino. A formação desses pontos ectópicos e o recrutamento de aPKC é independente do estado de fosforilação da treonina 833, resíduo localizado no PAR3, no domínio de ligação ao aPKC. Além disso, PAR3 induz o recrutamento ectópico de actina para a membrana apical do ectoderma peri-placoidal. E novamente, essa indução é independente do estado de fosforilação da treonina 833. Em conjunto, esses dados nos sugerem que PAR3 é suficiente para recrutar actina no placóide do cristalino e em contraste com o que foi visto em células migratórias, o estado de fosforilação da treonina 833 de PAR3 não interfere com a habilidade de PAR3 se associar com aPKC.

Palavras-chave: Actina. Embrião de galinha. Placóide do cristalino. Polarização celular. Proteínas PAR.

ABSTRACT

Melo MO. The role of PAR complex during lens placode embryogenesis [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The lens originates from a simple cuboidal epithelium that overlies the optic vesicle that evaginates from the neural tube, called pre-placodal ectoderm. The basal region of this pre-placodal ectoderm faces the optic cup and its apical region is exposed to the extraembryonic environment. At this stage, the actin filaments are distributed along its apical-basal sides. After the contact with the optic vesicle, the pre-placodal ectoderm undergoes intense changes, which include height increase and rearrangement into the pseudostratified lens placode. One of the expressive changes that occur is the accumulation of an apical actin network that drives apical constriction during the lens placode invagination. The appearance of this network is restricted to the placodal region and clearly follows polarity guidance cues particular to this region. The PAR proteins have been consistently associated with polarization events and the effect of PAR proteins segregation is important for the establishment and maintenance of cell polarity. Here, we propose to study the function of the PAR complex proteins and we focused on the role of the polarity protein PAR3 and its phosphorylation in the establishment of this apical actin network. To analyze the role of Par proteins during lens placode elongation in chick embryo, the pre-placodal ectoderm (HH9-10) was electroporated, with plasmids containing the interested PAR proteins, and it was analyzed in lens placode stage (HH13). The histological sections from electroporated embryos were subjected to actin labeling and immunofluorescence to identify the electroporated cells. Overexpression of PAR3 induced formation of spot-like ectopic actin clusters in the basolateral membrane of the lens placode. The formation of these clusters, as well as recruitment of aPKC was independent of the phosphorylation state of the Threonine 833 residue at the PAR3 aPKC-binding site. In addition, PAR3 induced ectopic actin networks in the apical membrane of the periplacodal ectoderm. Again, this induction was independent of the phosphorylation state of Threonine 833. Taken together, these data suggest that PAR3 is sufficient for actin recruitment in the lens placode. In contrast to previous reports in migrating cells, the phosphorylation state of PAR3 Thr833 does not interfere with its ability to associate with aPKC in lens placodal epithelia.

Keywords: Actin. Chicken embryo. Lens placode. Cell polarization. PAR proteins

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPKC – atypical Protein Kinase C
ARP - Actin-Related Protein
BMP – Bone morphogenetic proteins
BSA – Bovine Serum Albumin
CRB - Crumbs
CRIB - Cdc-Rac-Interacting Binding motif
Cdc42 - Cell division control protein 42
DAPI - 4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS – Fetal Bovine Serum
Fgf8 - Fibroblast growth factor
GAPs - GTPase-activating proteins
GEFs - guanine nucleotide-exchange factors
GFP – Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde)
HH – Hamburger and Hamilton
IRES - Internal Ribosomal Entry Site
JAM – Junctional Adhesion Molecule
LCM – Low calcium medium
LGL – Lethal giant larvae
MARK2 - microtubule-affinity-regulating kinase
MDCK Madin-Darby Canine Kidney
NGS – Normal Goat Serum (Soro normal de cabra)
PALS1 - protein associated with LIN7
PAR - Partitioning defective protein
PAR1 - Partitioning defective protein 1
PAR2 - Partitioning defective protein 2
PAR3 - Partitioning defective protein 3
PAR4 - Partitioning defective protein 4
PAR5 - Partitioning defective protein 5
PAR6 - Partitioning defective protein 6
PATJ – Pals associated tight-junction protein
PBS - Phosphate Buffered Saline

PFA – Paraformaldeído

Rac1 - Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

ROCK - Rho-associated protein kinase

Ser/Thr – Serina/Treonina

Tiam - T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein

VSVG - Vesicular Stomatitis Vírus G protein

ZO-1 - Zonula Occludens-1 protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama com a visão lateral detalhada do placóide do cristalino em desenvolvimento	23
Figura 2: Dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos no alongamento do placóide	25
Figura 3: Proteínas PAR e seus domínios de interação	29
Figura 4: Interação competitiva entre as proteínas de polarização apicais e basais	31
Figura 5: Modelo para o estabelecimento da polaridade epitelial em <i>Drosophila</i>	34
Figura 6: Fosforilação de PAR3 por ROCK em células migratórias	41
Figura 7: Proteínas truncadas de PAR6 de <i>Gallus gallus</i>	49
Figura 8: Esquema mostrando como foi feita a clonagem do DNCdc42	50
Figura 9: Esquema do ensaio de cálcio em células MDCKs	52
Figura 10: ZO-1 se mantém apical e beta-catenina polariza para o domínio apical durante o alongamento do placóide	55
Figura 11: A actina polariza para o domínio apical durante o alongamento do placóide.....	57
Figura 12: A proteína ARP3 acompanha a distribuição de actina durante o alongamento do placóide	59
Figura 13: O complexo PAR está presente no domínio apical do ectoderma pré-placoidal e do placóide	61

Figura 14: As proteínas PAR estão localizadas em diferentes subcompartimentos.....	63
Figura 15: O padrão de expressão de PAR1 é nuclear.....	65
Figura 16: Proteínas truncadas de PAR6 e aPKC.....	67
Figura 17: As proteínas truncadas de PAR6 e aPKC não inibiram o acúmulo apical de actina.....	68
Figura 18: Células MDCKs transfectadas com a proteína truncada PAR6(127-370).....	70
Figura 19: O DNCdc42 gera diversas alterações celulares no placóide do cristalino.....	72
Figura 20: O DNCdc42 endereçado para a região apical não afeta a polarização no placóide do cristalino.....	74
Figura 21: A superexpressão de PAR3 recruta actina ectópica na região basolateral da membrana	76
Figura 22: Domínios da proteína PAR3 de <i>Gallus gallus</i>	77
Figura 23: A superexpressão de PAR3T833A ou PAR3T833D recruta aPKC ectopicamente.....	78
Figura 24: Os mutantes de PAR3T833D e PAR3T833A não afetam a polarização de actina endógena no placóide do cristalino	80
Figura 25: A superexpressão de PAR3T833A ou PAR3T833D recruta actina ectopicamente.....	81
Figura 26: PAR3T833A aumenta a actina apical na ectoderme periplacoidal.....	82

Figura 27: Representação do possível papel do PAR3 no recrutamento de actina .92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades bioquímicas e domínios importantes contidos nas Proteínas PAR.....	27
Tabela 2: Estádios embrionários e tempos de incubação	43
Tabela 3: Anticorpos primários	45
Tabela 4: Anticorpos secundários e marcadores fluorescentes.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>Morfogênese do cristalino durante o desenvolvimento embrionário</i>	21
1.2	<i>Alongamento apico-basal do placóide do cristalino</i>	24
1.3	<i>Polarização celular e proteínas de polarização</i>	27
1.4	<i>Função das proteínas PAR</i>	31
1.4.1	<i>Função das proteínas PAR no estabelecimento da polaridade</i>	32
1.4.2	<i>Função das proteínas PAR na manutenção da polaridade</i>	37
1.5	<i>Função da Proteína PAR3 na polarização</i>	39
2	OBJETIVOS	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	<i>Obtenção dos embriões de galinha</i>	43
3.2	<i>Coleta dos embriões de galinha</i>	43
3.3	<i>Obtenção dos cortes congelados</i>	44
3.4	<i>Imunofluorescência</i>	44
3.5	<i>Eletroporação in ovo</i>	47
3.6	<i>Clones e respectivos plasmídeos utilizados na eletroporação</i>	47
3.7	<i>Quantificação da intensidade de fluorescência</i>	50
3.8	<i>Cultivo, transfecção e ensaio de cálcio em células MDCKs</i>	51
4	RESULTADOS	53
4.1	<i>Caracterização dos elementos de polarização apico-basal durante a embriogênese inicial do cristalino</i>	53
4.1.1	<i>Proteínas de junções celulares</i>	53
4.1.2	<i>Citoesqueleto de actina</i>	56
4.1.3	<i>Proteínas de polarização apical</i>	60
4.1.4	<i>Proteína de polarização baso-lateral</i>	64
4.2	<i>Interação do complexo par apical no recrutamento de actina</i>	64
4.3	<i>Interação do complexo par na manutenção e estabelecimento das junções celulares</i>	68
4.4	<i>Ativação do complexo par</i>	71
4.5	<i>Par3 induz a formação de agregados ectópicos de actina</i>	75
4.6	<i>O recrutamento de actina é independente da fosforilação da treonina 833</i>	77
5	DISCUSSÃO	84

5.1 Polarização dos elementos celulares durante o alongamento do placóide.	84
5.2 O Complexo PAR na polarização do placóide do cristalino.....	87
5.3 Cdc42 na polarização do placóide do cristalino.....	88
5.4 PAR3 na polarização de actina apical no placóide do cristalino	90
6 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES	103
APÊNDICE A - Sequência dos primers.....	103
APÊNDICE B - Alinhamento das sequências de PAR-1.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Morfogênese do cristalino durante o desenvolvimento embrionário

O cristalino é uma estrutura biconvexa, maciça e transparente que está situado na porção distal do olho. Embriologicamente, o cristalino é formado durante o processo de neurulação. Após a elevação das dobras neurais e fechamento do tubo neural, as vesículas ópticas evaginam do tubo neural na região mais anterior da cabeça (telencéfalo) e irão dar origem ao globo ocular incluindo a retina e epitélio pigmentar. Recobrimdo toda a região cefálica existe um tecido epitelial cuboidal chamado de ectoderma cefálico, desse ectoderma apenas as células que recobrem a vesícula óptica evaginada do tubo neural darão origem ao cristalino (Lovicu, McAvoy, 2005). Para que o cristalino chegue à sua forma e composição final ocorrem diversas alterações na morfologia do tecido precursor. Inicialmente, o espaço entre o tubo neural e o ectoderme, na área correspondente ao futuro cristalino, é preenchido por células mesenquimais. Com a evaginação da vesícula óptica, esta desloca as células mesenquimais e entra em íntimo contato com o ectoderme. O ectoderme que recobre a vesícula óptica (chamado de ectoderme pré-placoidal) é um epitélio simples, formado por células cuboides, morfologicamente indistintas do ectoderme circundante, a não ser por recobrir a vesícula óptica (Figura 1). Como qualquer epitélio clássico, o ectoderme pré-placoidal é exposto aos diferentes microambientes nos domínios apical e basal. No domínio basal, o ectoderma pré-placoidal está em contato com a matriz extracelular, enquanto que o domínio apical está em contato com o fluido extraembrionário.

Apesar da íntima aposição entre vesícula óptica e o ectoderme pré-placoidal, existe um pequeno espaço entre estes dois tecidos, local onde tanto a vesícula óptica, quanto o cristalino em desenvolvimento, irão produzir a matriz extracelular (Zwaan, Hendrix, 1975). Após o contato com a vesícula óptica, e sob seu efeito indutivo, com a produção de BMP, Fgf8 e Delta (Ogino et al., 2012), as células do ectoderme pré-placoidal aumentam 4 vezes a sua altura no sentido basal-apical, se tornam colunares e formam um tecido pseudoestratificado, o placóide do cristalino (Figura 1, Lang, 2004; Lovicu, McAvoy, 2005; Sullivan et al., 2004; Zwaan, Hendrix, 1975). Posteriormente, o placóide do cristalino invagina, de modo sincronizado com a invaginação da vesícula óptica (Figura 1), até fundir suas bordas e gerar a vesícula

do cristalino.

As células adjacentes ao placóide do cristalino, que não se alongam e continuam como um epitélio simples (Figura 1), se fundem na porção mais distal do olho e formam as camadas da córnea junto com as células da crista neural, que migram para essa região (Cvekl, Tamm, 2004). A vesícula óptica dará origem à retina e ao epitélio pigmentar (Figura 1), enquanto que sua extremidade anterior cresce e forma o músculo da íris e o corpo ciliar (Cvekl, Tamm, 2004).

Figura 1: Diagrama com a visão lateral detalhada do placóide do cristalino em desenvolvimento. O ectoderme pré-placoidal começa como um epitélio simples cuboidal (E), que recobre a vesícula óptica (VO) evaginada do tubo neural, em embriões HH10. As células que recobrem e estão em contato com a vesícula óptica, se alongam e formam um tecido pseudoestratificado, o placóide do cristalino (P), em embriões HH13. Posteriormente, o placóide do cristalino invagina junto com a vesícula óptica para formar a vesícula do cristalino. As células adjacentes ao placóide, o ectoderme peri-placoidal (EPP), não alonga e se mantém como um epitélio cuboide simples por todo o processo. A retina (R) e o epitélio pigmentar (EP) são, respectivamente, as estruturas mais distais e proximais da vesícula óptica.

Os próximos passos na formação do cristalino envolvem, principalmente, a diferenciação dos dois tipos celulares presentes no cristalino: as células das fibras primárias e as células do epitélio do cristalino. As células das fibras primárias alongam-se em direção ao lúmen da vesícula do cristalino, obliterando-o (Ogino, Yasuda, 2000). Estas fibras são responsáveis pela propriedade de translucidez e refringência do cristalino. As células do epitélio do cristalino na porção mais distal da lente, por sua vez, permanecem indiferenciadas e proliferativas, gerando as células das fibras secundárias, que são adicionadas às fibras primárias durante toda a vida do indivíduo (Lovicu, McAvoy, 2005; Wride, 1996).

1.2 Alongamento apico-basal do placóidio do cristalino

O alongamento apico-basal em epitélios é caracterizado molecularmente e morfológicamente pelo aumento do eixo apico-basal, reorganização do citoesqueleto e, a nível de membrana, redistribuição de junções aderentes e distribuição diferenciada de proteínas nas superfícies apicais, basais e laterais.

Dependendo do tipo celular, marcadores das membranas apicais e basolaterais podem estar relacionados à futura função do epitélio em questão, como canais iônicos na região basolateral (e.g. Na⁺/K⁺ ATPase; Nelson, Hammerton, 1989) ou glicoproteínas na membrana apical (e.g. gp135; Cohen et al, 2004; Ojakian et al, 1990). Por outro lado, também são utilizados marcadores mais gerais, como junções oclusivas e junções aderentes (revisto em Gibson, Perrimon, 2003; Macara, 2004). Estes últimos têm sido mais comumente utilizados em trabalhos recentes devido à sua universalidade durante o alongamento apico-basal.

Durante o alongamento do placóide do cristalino, as células do ectoderme pré-placoidal demonstram todas as características morfológicas de alongamento apico-basal, acompanhado de um intenso rearranjo ultraestrutural. As células formam um tecido pseudoestratificado e aumentam significativamente de comprimento, evoluindo de 15µm para 50µm imediatamente antes do início da sua invaginação (Byers, Porter, 1964). A membrana apical fica irregular, apresentando microvilosidades e vesículas exocíticas e, a adesão intercelular aumenta, diminuindo o espaço intercelular (Byers, Porter, 1964; Schook, 1980; Wrenn, Wessels, 1969). Esta aproximação célula-célula pode ser devido à redistribuição de junções

aderentes. O realocamento de junções para a porção apical faz parte do processo do alongamento apico-basal em eventos de desenvolvimento epitelial. Por exemplo, durante a gastrulação de *Drosophila melanogaster*, as células ventrais correspondentes ao mesoderma se alongam e redistribuem as junções aderentes da região baso-lateral para a região apical (Kolsch et al., 2007).

O ectoderme pré-placoidal no estágio HH11 inicial, apresenta células cuboides, com núcleo esférico centralizado, e citoplasma homogêneo, com poucos filamentos de microtúbulos (Figura 2, Byers, Porter, 1964). Após exposição a presença indutiva da vesícula óptica subjacente, surgem filamentos de microtúbulos paralelos ao eixo apico-basal e os núcleos e demais organelas se movem para uma posição mais basal (Bancroft, Bellairs, 1977; Byers, Porter, 1964; Zwaan et al., 1969). Os microtúbulos são mais visíveis na região apical (Figura 2, Maraysa O. Melo) e sua presença é menos visível na região basal (Byers, Porter, 1964).

Figura 2: Dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos no alongamento do placóide. O citoesqueleto de microtúbulos não tem uma organização evidente (A), mas são mais visíveis na região apical a partir do estágio de placóide (B). Insertos ilustram os aumentos das áreas delimitadas em A e B. No canto esquerdo de cada figura, ilustração da vesícula óptica (VO), ectoderme pré-placoidal (E) e placóide (P). Imagem de Maraysa O. Melo

A polimerização direcionada de microtúbulos ocorre em outros eventos de crescimento apico-basal e tem sido proposto como um dos mecanismos que contribuem para este fenômeno (Bre et al., 1990; Burnside, 1971; Ojakian et al., 1997; Schoenwolf, Powers, 1987). Por exemplo, a disposição de microtúbulos em células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) varia com o estado de diferenciação apico-basal destas (Bacallao et al., 1989). Quando sub-confluentes, células MDCK são achatadas e apresentam distribuição radial de microtúbulos. O aumento do contato intercelular inicia a diferenciação apico-basal, que é acompanhada do aparecimento de feixes de microtúbulos paralelos ao eixo de alongamento com o terminal positivo direcionado para a região basal e negativo para a região apical (Bacallao et al., 1989; Bre et al., 1990). A inibição da polimerização de microtúbulos por colchicina interfere com a diferenciação apico-basal de células MDCK, sugerindo que esta é necessária para a epitilização (Ojakian et al., 1990). Da mesma forma, a despolimerização de microtúbulos de nêurulas de embrião de galinha diminui o alongamento apico-basal da placa neural (Schoenwolf, Powers, 1987). Células do epitélio do cristalino cultivadas em meio com colchicina tem o alongamento celular reduzido, mostrando a importância da polimerização de microtúbulos para formar o placóide do cristalino (Piatigorsky et al., 1972).

Nosso laboratório demonstrou anteriormente, que no estágio de ectoderme pré-placoidal, a actina filamentosa e miosina II estão distribuídas de modo homogêneo por todo o contorno celular (Borges et al., 2011). Após o alongamento das células do ectoderme pré-placoidal para formar o placóide do cristalino, a actina filamentosa e miosina II se acumulam na região apical do placóide do cristalino. Quando o cristalino inicia o processo de invaginação, esta expressão aumentada de actina filamentosa e miosina II, se mantêm na porção apical das células do placóide. A inibição da polimerização do citoesqueleto de actina e da atividade da miosina, impedem a invaginação do placóide do cristalino, sugerindo que a concentração apical de actina é necessária para a progressão da morfogênese do cristalino (Borges et al, 2011).

Apesar das descrições detalhadas das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do placóide estarem disponíveis desde o século passado, pouco se sabe sobre o que impulsiona o rearranjo do citoesqueleto durante o desenvolvimento do placóide.

1.3 Polarização celular e proteínas de polarização

A polarização celular é um evento no qual há a distribuição assimétrica de elementos celulares, conferindo diferentes funções à diferentes tecidos (Rodriguez-Boulán, Nelson, 1989). Todas as células, exceto raras exceções, apresentam polaridade. Os sinais de polarização têm como função, dentre outras, promover a migração celular, o contato intercelular, para a organização de células em tecidos, o destino celular, através das divisões celulares assimétricas e, a morfogênese.

As moléculas envolvidas na polarização celular e suas funções são conservadas durante a evolução, atuam na polarização do ovócito de *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila*, na polarização apico-basal de epitélio de *Drosophila* e em cultura de células epiteliais de mamíferos, em neuroepitélio de vertebrados, na migração celular de astrócitos, na determinação do axônio, na divisão assimétrica de células tronco, dentre outros (Afonso, Henrique, 2006; Macara, 2004; Suzuki, Ohno, 2006).

Uma característica importante do estabelecimento de polaridade celular é a distribuição assimétrica de proteínas de polarização. Cada uma das proteínas de polarização apresenta propriedades bioquímicas particulares e se associam em domínios distintos (tabela 1) na região apical e basal (Macara, 2004).

Tabela 1: Propriedades bioquímicas e domínios importantes contidos nas Proteínas de polarização.

Tabela 1. Proteínas PAR em vertebrados	
PAR1 (= MARK, EMK)	Quinase de Ser/Thr
PAR3	Contém Domínios PDZ
PAR4 (=LKB1)	Quinase de Ser/Thr
PAR5 (=14-3-3)	Proteína adaptadora
PAR6	Contém Domínios PDZ e Semi-CRIB (<i>Cdc-Rac-Interacting Binding motif</i>) e PBI
Apkc	Quinase de Ser/Thr, PBI
Cdc42	GTPase, domínio de ligação ao GTP

PAR3/PAR6/aPKC formam um complexo ternário, na região apical de epitélios polarizados, através da interação entre domínios específicos dessas proteínas (Figura 3) e através da ativação pela GTPase Cdc42 (Joberty et al., 2000). A principal característica de PAR3 e PAR6 é a ausência de domínios catalíticos.

PAR-6 possui três domínios altamente conservados. O domínio PB1, na região N-terminal, de associação com a proteína aPKC; o domínio PDZ de associação à proteína PAR3 e o domínio Semi-CRIB/PDZ de associação com GTPases, como Rac1 e Cdc42 (Figura 3, Assémat et al., 2008; Macara, 2004).

A proteína PAR3 possui um domínio CR1 na região N-terminal, responsável por sua auto-oligomeração e associação à membrana celular (Krahan et al., 2010). A interação de PAR3 com PAR6/aPKC para a formação do complexo PAR apical, é feita através da ligação PDZ-PDZ de PAR6 e PAR3 ou via domínio de ligação ao aPKC (Figura 3, Assémat et al., 2008; Izumi et al., 1998; Macara, 2004). Os domínios PDZ2 e PDZ3 de PAR3 podem se ligar aos lipídios de membrana ou a microtúbulos e, na região C-terminal, o domínio 4N1 interage com a proteína Tiam1, um fator de ativação da GTPase Rac1 que troca GDP por GTP (Chen, Zhang, 2013; Nakayama, 2007).

A proteína aPKC (atypical protein kinase C) é uma serina/treonina quinase que se associa à proteína PAR6 através de seu domínio PB1. A proteína possui um domínio *zinc-finger* (Zn) com atividade reguladora e um domínio quinásico de associação ao PAR3 (Figura 3). Quando ativada, a proteína aPKC muda de conformação, expondo seu domínio catalítico para a ligação e fosforilação de seu substrato (Costa-Junior et al., 2009). A associação PAR3-aPKC faz com que aPKC fosforile PAR3 e a interação seja desfeita, isso explicaria porque em vários exemplos de epitélios polarizados, PAR3 se localiza em um domínio subapical diferente de PAR6/aPKC (Figura 3, Chen, Zhang, 2013; Maraca 2004; Tepass, 2012).

A proteína de polarização Cdc42 faz parte da família das GTPases, quando ligadas a GTP podem ativar efetores e quando ligadas a GDP estão em sua forma inativa. As GTPases ciclam do estado ativo para inativo devido à ação das proteínas *guanine nucleotide-exchange factors* (GEFs) e das *GTPase-activating proteins* (GAPs), respectivamente.

A GTPase Cdc42 foi identificada, inicialmente, em *Saccharomyces cerevisiae* e sua função é importante para a formação de brotamento durante a divisão celular desse organismo. A redução de Cdc42 inibe a formação de brotamentos e causa

desorganização do citoesqueleto de actina (Johnson, Pringle, 1990). Além de sua função na regulação da polaridade celular, na organização do citoesqueleto de actina, na migração polarizada e no ciclo celular, a proteína Cdc42 atua, também, na ativação das proteínas do complexo PAR através da sua ligação e fosforilação da proteína PAR6 (Heasman, Ridley, 2008).

A proteína PAR6 possui um domínio de interação a GTPases chamado de domínio Semi-CRIB, pois ele não possui alguns resíduos presentes em um domínio CRIB completo. Como esse domínio de ligação do PAR6 ao Cdc42 não está completo, para que a proteína Cdc42 se ligue e ative PAR6, ela necessita do domínio semi-CRIB e do domínio adjacente, o PDZ (Garrard, 2003; Hutterer, et al, 2004; Lin et al, 2000; Yamanaka et al, 2001). Quando a GTPase Cdc42 se liga ao domínio semi-CRIB/PDZ de PAR6, ocorre uma mudança conformacional na proteína PAR6 que expõe o domínio de ligação ao aPKC. Desta maneira, PAR6 se liga à aPKC e é responsável pelo seu posicionamento apical (Garrard, 2003).

Figura 3: Proteínas PAR e seus domínios de interação. A proteína PAR6 possui um domínio PB1 de ligação ao domínio PB1 de aPKC, um domínio semi-CRIB de ligação à GTPase Cdc42 e um domínio PDZ de ligação ao PDZ1 de PAR3. Par3 possui um domínio de ligação (aPKC binding domain) ao domínio quinásico de aPKC. Domínios baseados em Macara, 2004 e Nakayama, 2007.

A proteína PAR-1 (também conhecido como MARK-2 e EMK), identificada inicialmente em *C. elegans* (Kemphues, 2000), foi identificada posteriormente em mamíferos, e onde também está relacionada com eventos de polarização em epitélios, em neurônios, em linhagens celulares renais e hepáticas (Bohm et al., 1997; Cohen, 2004). A atividade de PAR-1 e sua associação a membrana basolateral precede e é necessária para a organização e estabilização de microtúbulos durante as fases iniciais de polarização (Bohm et al., 1997; Cox et al., 2001; Doerflinger, 2003). A proteína PAR1, está localizada na região baso-lateral de epitélios polarizados e possui um domínio catalítico responsável pela fosforilação de seus substratos. PAR1 é uma proteína do tipo MARK, que regula a atividade das MAPs (Microtubule Associated Proteins). As MAPs promovem a polimerização e estabilização de microtúbulos e sua atividade depende do estado de fosforilação de sítios de serina-treonina (revisto em Drewes et al., 1998). Na maioria dos casos, a fosforilação das MAPs diminui sua afinidade por microtúbulos. As serina/treonina quisases do tipo MARK (Microtubule-Affinity Regulating Kinases) foram isoladas pela sua habilidade em fosforilar MAPs. Quando a proteína MARK fosforila MAPs, esta última se dissocia dos microtúbulos e consequentemente, os microtúbulos perdem a estabilidade, e podem ser polimerizados ou despolimerizados.

Para que as proteínas de polarização segreguem para domínios específicos da membrana celular, elas interagem fisicamente e/ou se reprimem mutualmente – na região apical se localizam o complexo PAR6/PAR3/aPKC e o complexo CRIB/PALS1/PATJ, enquanto que restritos à região basolateral encontram-se PAR1, PAR5, PAR4 e LGL (Figura 4, Joberty et al., 2000, Macara, 2004; Suzuki, Ohno, 2006).

A segregação de PAR-3/PAR-6/aPKC e PAR-1/PAR-5 em dois compartimentos diferentes, se dá por fosforilação inibitória recíproca (Figura 4). Em células epiteliais de mamíferos, aPKC fosforila PAR1 na treonina 595 (humanos) no nível das junções oclusivas. Assim, PAR5, proteína regulatória que se liga a proteínas fosforiladas, se liga à PAR1 e impede sua associação ao domínio próximo à aPKC (Suzuki et al., 2004). Em células epiteliais de *Drosophila*, PAR1 fosforila PAR-3 em dois resíduos: na serina 151, na região N-terminal e na serina 1085, na região C-terminal. Essas fosforilações criam regiões de ligação de PAR3 ao PAR5 e como a serina1085 fica próxima ao domínio de interação de PAR3 ao aPKC, a ligação entre ambas as proteínas é inibida, consequentemente PAR3 não se liga à membrana baso-lateral e

não forma um complexo com PAR6/aPKC no córtex baso-lateral (Benton, St Jonston, 2003; Goldstein, Macara, 2007).

Figura 4: Interação competitiva entre as proteínas de polarização apicais e basais. O esquema representa a interação das proteínas de polarização em epitélios de mamíferos e *Drosophila*. Em vermelho, as proteínas que se localizam no domínio apical. Em azul, as proteínas do domínio baso-lateral e em verde, proteínas que não possuem uma localização assimétrica clara. Setas indicam interação física. □ : indica interação antagonista (Suzuki, Ohno, 2006).

1.4 Função das Proteínas PAR

As proteínas PAR são importantes para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular. No estabelecimento da polaridade, há uma quebra da simetria celular e os elementos celulares se distribuem assimetricamente, como por exemplo, durante a polarização dos eixos embrionários e durante a divisão, especificação do destino celular e migração celular. Na manutenção da polaridade celular, as células já possuem assimetria, mas precisam manter a integridade celular, permitir a dinâmica de elementos intracelulares e permitir remodelamento tecidual durante eventos de morfogênese.

1.4.1 Função das proteínas PAR no estabelecimento da polaridade

Inicialmente identificado no nematodo *Caenorhabditis elegans*, as proteínas PAR (*PAR*tioning defective) tem papel fundamental na divisão assimétrica do zigoto desse animal (revisto em Rose, Kemphues, 1998).

Antes da fertilização do ovócito de *C. elegans*, os filamentos de actina, a miosina e as proteínas PAR (*partitioning defective*), proteínas de polarização, estão distribuídas simetricamente pela célula. Após a fertilização, há uma perda do citoesqueleto de actina e miosina na região posterior, região de entrada do espermatozoide. A fertilização leva à contração desse citoesqueleto e o fluxo seletivo de proteínas PAR da região cortical, em direção à região anterior. Desta maneira, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC são levadas para a região anterior, enquanto que a proteína PAR1 fica restrita à região posterior, estabelecendo assim, uma identidade antero-posterior (Cowan, Hymam, 2007; Goldstein, Hird, 1996; St Johnston, Alringer, 2010). Mutações nas proteínas PAR, em *C. elegans*, causam alterações nos padrões das clivagens iniciais do embrião, que passam a ser simétricas e não assimétricas e, alterações no número e diferenciação de tipos celulares, como por exemplo, ausência de intestino e células germinativas (Rose, Kemphues, 1998).

Ao contrário do *C. elegans*, em *Drosophila* a polarização do ovócito ocorre antes da fertilização, através de sinais vindos das células foliculares que circundam a região posterior do ovócito. As proteínas de polarização PAR1 e LGL (*lethal giant larvae*) ficam restritas à região posterior e, as proteínas PAR3, PAR6, aPKC e os microtúbulos, se organizam na região anterior e lateral do ovócito (Doerflinger et al., 2006, Doerflinger et al., 2010, St Johnston, Alringer, 2010). O mutante de PAR3, que não possui o domínio de ligação ao aPKC, não segrega assimetricamente, se mantém ao longo do córtex celular e interfere com a localização de PAR6 na região anterior, indicando que PAR6 segrega assimetricamente se ligando à PAR3 (Doerflinger et al., 2010). O mutante de PAR1, no sítio de fosforilação por aPKC, faz com que PAR1 se localize ao longo de todo o córtex celular e além disso, leva a um acúmulo de microtúbulos por todo o ovócito. Esses dados indicam que a interação

física de PAR3/PAR6/aPKC e a interação antagonista dessas proteínas com PAR1, é importante para a assimetria antero-posterior. Além disso, esses dados sugerem que PAR1 possa estar controlando a organização de microtúbulos, inibindo-os de se ancorar ao córtex posterior do ovócito (Doerflinger et al., 2010).

As mesmas moléculas que se distribuem assimetricamente durante a polarização antero-posterior de embriões de *C. elegans* e *Drosophila* também estão presentes na polarização apico-basal em epitélios.

Em *Drosophila*, a blastoderme é formada a partir de um processo chamado de celularização. Inicialmente, os núcleos não estão delimitados por membranas, formando um embrião sincicial. Com a progressão do desenvolvimento, esses núcleos migram perifericamente para o córtex do ovócito e a membrana celular começa a ser formada entre esses núcleos gerando uma monocamada epitelial (Figura 5). Nesse processo, os mutantes de PAR6, que não se ligam à Cdc42, se mantêm no citoplasma, PAR3 não é recrutado para o domínio apical e a proteína Armadillo/beta-catenina não se concentra na região apical e lateral da membrana celular (Hutterer et al., 2004). Baseados nesses dados, foi criado um modelo para explicar o estabelecimento da polaridade apico-basal das células epiteliais neste organismo. Antes do processo de celularização, as proteínas do complexo PAR estão localizadas no citoplasma, quando a membrana celular é formada, a GTPase Cdc42 ativada na região apical recruta e ativa PAR6 que, por sua vez, recruta aPKC para a região apical, em contrapartida, a proteína LGL fica restrita à região baso-lateral devido à fosforilação por PAR6 na região apical (Figura 5, Hutterer et. al., 2004).

Figura 5: Modelo para o estabelecimento da polaridade epitelial em *Drosophila*. Durante a celularização PAR6 está localizado no citoplasma e os domínios apicais e baso-laterais não existem. Quando a celularização é completada, o Cdc42 ativado recruta aPKC para o córtex apical, para estabelecer o compartimento apical. aPKC é recrutado para o domínio apical, pela ligação ao PAR6, e fosforila LGL, restringindo-o ao domínio baso-lateral. A manutenção da polaridade celular envolve a inibição mútua entre o domínio apical e baso-lateral. Figura modificada de Hutterer, 2004.

A função das proteínas PAR no estabelecimento de polaridade também é bastante explorada no paradigma experimental de tecidos de vertebrados em cultura de células MDCKs (Madin-Darby Canine Kidney). Nessas células, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC co-localizam com ZO-1 no domínio apical (Suzuki et al., 2001). Para o estudo do estabelecimento da polaridade nesse modelo, as células são

cultivadas em meio com baixo cálcio para desfazer a interação célula-célula. A restauração dos níveis normais de cálcio promove o restabelecimento das junções e do compartimento apical. As proteínas do complexo PAR3/PAR6/aPKC são recrutadas para o ponto de contato célula-célula e, são levadas para a região apical, à medida que as junções vão sendo formadas. Acredita-se que o complexo PAR se localize apicalmente devido a interação de PAR3 com a proteína JAM, recentemente identificada como componente de junções oclusivas. Essa interação ocorre através do domínio PDZ de PAR3. A superexpressão do mutante de JAM, sem a porção citoplasmática, afeta a localização de PAR3, aPKC e ZO1, no ponto de contato entre as células, mas isso ocorre apenas quando as células estão pouco confluentes, sugerindo que JAM seja importante para as fases iniciais do estabelecimento da polaridade e recrutamento de PAR3 (Ebnet et al, 2001).

Uma vez que PAR3, PAR6, aPKC são recrutadas, as proteínas precisam ser ativadas para formar o complexo na região apical, para a maturação das junções, recrutamento do citoesqueleto de actina e outras proteínas importantes, levando ao estabelecimento da assimetria e polaridade do epitélio (Ohno, 2001). Foi visto que a proteína Cdc42 é ativada a medida que as células vão formando junções via E-caderina (Kim et al., 2000) e que, a proteína Cdc42 ativada, é responsável pela ativação do complexo PAR, ligando-se ao domínio semi-CRIB de PAR6 (Garrard, 2003). Em células MDCK, o mutante de PAR6 sem o domínio de interação com Cdc42 não é capaz de se ligar ao aPKC. Além disso, a superexpressão de PAR-6 com deleção para o domínio de interação ao aPKC afeta a distribuição de junções oclusivas na membrana apical e, a superexpressão do dominante negativo de aPKC afeta a localização apical tanto de PAR6 quanto de PAR3 e de ZO-1 (junções oclusivas) durante o estabelecimento da polaridade (Gao, Macara, 2004; Joberty et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001). Esses dados indicam que a formação do complexo PAR é importante para o estabelecimento da polaridade e sugerem que Cdc42 ligado à PAR6 é responsável pela atividade de aPKC (Yamanaka et al., 2001).

As proteínas PAR não têm papel apenas na polarização antero-posterior de embriões, ou apico-basal de epitélios, elas estão presentes também em outros eventos celulares.

Por exemplo, durante a formação de “espinhos” dendríticos, que são pequenas protrusões dos neurônios, formados por filamentos de actina e que recebem

principalmente sinais excitatórios. Foi visto que a redução de PAR3 em neurônios do hipocampo, não reduziu o número de protrusões mas causou defeitos em sua morfologia, além disso, a redução de PAR6, presente nesses espinhos, reduz o número de protrusões formadas. Em contrapartida, a superexpressão de PAR6 leva a um aumento na densidade dessas protrusões, semelhante ao mutante constitutivamente ativo de aPKC, indicando que as proteínas PAR possuem papel na formação e manutenção dessas estruturas (Zhang, Macara, 2008).

As proteínas PAR também estão envolvidas com o crescimento de neuritos. Foi visto que a inibição de PAR1 (MARK-2) bloqueia o crescimento do neurito e como os microtúbulos precisam se desestabilizar para que o neurito estenda, foi sugerido que PAR1 seja importante para a dinâmica de microtúbulos e, conseqüentemente, para o crescimento do neurito (Biernat et al, 2002). PAR3 e aPKC são importantes também em células neuronais para a especificação do axônio. Foi visto que ambas as proteínas estão presentes na extremidade do neurito e que PAR3 se associa a uma proteína motora de microtúbulos, a KIF3A. Quando essas células expressam o dominante negativo de PAR3 e de KIF3A, as proteínas PAR3 e aPKC não se localizam mais na ponta do neurito e a polaridade é perdida, fragmentos da região N-terminal de PAR3 e KIF3A, inibem o crescimento do neurônio e induzem a formação de neuritos pequenos. Esses dados sugerem que PAR3 é transportado para a ponta do neurito via KIF3A e que as proteínas PAR3 e aPKC são importantes para a polarização de neuritos.

O complexo PAR está relacionado também à divisão celular assimétrica, mecanismo característico de diferenciação celular. Em neuroblastos de *Drosophila*, células progenitoras de neurônios, PAR3/PAR6/aPKC e Cdc42 estão presentes no domínio apical. O dominante negativo de Cdc42, leva a expansão do domínio de PAR6/aPKC para a região basal, mas PAR3 se mantém localizado no domínio apical. O Cdc42 constitutivamente ativo, faz com que PAR6/aPKC se localize por todo o córtex celular e as divisões celulares se mantêm simétricas. O mutante de PAR6 na região de ligação ao Cdc42 faz com que aPKC e o próprio PAR6 se localizem no citoplasma, semelhante ao que acontece com a perda de função do Cdc42. Esses dados sugerem que a interação Cdc42/PAR6/aPKC é suficiente e necessária para a localização cortical dessas proteínas, que a localização apical de PAR6/aPKC/Cdc42 é importante para as divisões assimétricas e, que PAR3 está a

montante dessas proteínas nesse contexto, pois se mantém no domínio apical com o dominante negativo de Cdc42 (Atwood et al., 2007).

O processo de migração celular também requer uma polarização para que a célula se movimente para o sentido correto. Estímulos extracelulares ativam moléculas responsáveis por guiar a polarização da célula que irá migrar. A proteína de polarização Cdc42 está presente na frente de migração da célula e sua inibição afeta a direcionalidade da migração. PAR3/PAR6/aPKC também estão presentes na frente de migração das células e, junto com Cdc42, as proteínas PAR tem papel na reorientação do centro organizador de microtúbulos e do Golgi que acompanha o direcionamento da migração de astrócitos em cultura (Etienne-Manneville, Hall, 2001; Ridley et al, 2003).

Em células em migração, a GTPase Cdc42 também tem função importante na formação de protrusões. De fato, as proteínas Cdc42 e aPKC são ativadas e encontrados na frente de migração de astrócitos (Ridley et al., 2003). Em contraste, as proteínas PAR não são requeridas para a formação, mas sim para a correta orientação das protrusões. A redução da expressão de PAR3 em células Vero, induz a formação de vários lamelipódios sem polaridade definida (Nakayama et al, 2007).

1.4.2 Função das proteínas PAR na manutenção da polaridade

As etapas que levam a polarização do epitélio *in vivo* não são muito conhecidas, mas o que se sabe é que em um epitélio polarizado, as células estão unidas por junções celulares, que dividem o domínio apical do baso-lateral. As junções oclusivas, localizadas no domínio mais apical, servem como barreira ao fluxo de moléculas entre as células, e são utilizadas como marcadores de domínio apical. As junções aderentes estão localizadas logo abaixo das junções oclusivas, se associam ao citoesqueleto de actina e separam o domínio apical do domínio baso-lateral. As proteínas PAR também estão presentes em epitélios, com PAR3, PAR6 e aPKC distribuídas ao longo da região apical, enquanto que as proteínas PAR1 e LGL ocupam o domínio baso-lateral e por fim, a região de contato das células com a matriz extracelular que é definida como domínio basal, onde estão presentes receptores de membrana, as integrinas, actina e PAR1 (Chen, Zhang, 2013; St Johnston, Alringer, 2010; Suzuki, Ohno, 2006).

As células MDCKs são comumente utilizadas para se estudar o estabelecimento de junções celulares em epitélios, mas também são ótimos modelos de estudo da manutenção da polaridade. Para se estudar o efeito das proteínas de polarização na manutenção da polaridade, as células são apenas transfectadas com as proteínas de interesse e não são submetidas a níveis baixos de cálcio. Em células MDCKs, o PAR6, sem os primeiros aminoácidos da região N-terminal (não interage com aPKC), e aPKC, apenas com o domínio de ligação ao PAR6, rompem e levam a perda das junções oclusivas (Gao et al., 2002). A superexpressão apenas do domínio semi-CRIB/PDZ de PAR6 também rompe as junções oclusivas, nesse caso, PAR6 pode se ligar a Cdc42 mas não as outras proteínas do complexo apical (Garrard et al., 2003). Esses dados indicam que a interação dessas proteínas é importante para a manutenção das junções e da polaridade dessas células.

Nas células foliculares do ovócito de *Drosophila*, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC localizam-se na região apical mas em subdomínios diferentes, com PAR3 acima de PAR6/aPKC. Essa sub-localização deve-se à fosforilação de PAR3 por aPKC. A indução do PAR3 com uma mutação no domínio de fosforilação pelo aPKC, causa desorganização das células e alteração do formato celular. Algumas células do epitélio de *Drosophila* fazem transição cuboide-colunar, nessas células, o mutante de PAR3 (não é fosforilado por aPKC) afeta essa transição. Além disso, esse mutante causa localização de Armadillo/Beta-catenina na região apical junto com aPKC e induz a constrição apical (Moraes-de-Sá et al., 2010), sugerindo que o mutante recruta moléculas de junções em excesso, desencadeando uma diminuição da área apical. Esses dados mostram a importância funcional da fosforilação de PAR3 por aPKC para a manutenção da polarização apical. Um outro estudo em células epiteliais de *Drosophila*, mostrou que o complexo PAR6/aPKC/Cdc42 podem ter uma função separada de PAR3. Mutações pontuais em regiões específicas do Cdc42, PAR6 e aPKC causam rompimento das junções aderentes. Em contraste, a deleção de PAR3 não tem efeito sobre as junções e nem sobre outras proteínas de polarização analisadas (Leibfried et al., 2008).

A proteína de polarização aPKC, junto com LGL, também é importante para a polarização apico-basal dos blastômeros de *Xenopus*, aPKC está localizada apicalmente e LGL baso-lateralmente. A superexpressão de aPKC leva a uma expansão do domínio apical e reposicionamento das junções oclusivas. Em

contraste, a injeção de aPKC sem seu domínio quinásico leva a uma expansão do domínio lateral e perda de junções oclusivas (Chalmers et al., 2004).

As proteínas PAR também podem guiar a polarização durante processos de morfogênese. Na gastrulação de *C. elegans*, a ingressão das células em direção a blastocele é acompanhada pelo acúmulo apical de miosina e constrição apical. Nesse modelo, as proteínas PAR se localizam apicalmente antes do recrutamento de miosina, quando há a mutação de PAR3 e PAR6 nessas células, o recrutamento apical de miosina é inibido e as células sofrem atraso na internalização (Nance et al., 2003).

As proteínas PAR também estão envolvidas na constrição apical das células da *amnioserosa* de *Drosophila*. Essas células recobrem a região dorsal deste animal e sofrem contração durante o processo de internalização para o fechamento da região dorsal. As células da *amnioserosa* oscilam entre momentos de contração e relaxamento, formando ou desfazendo a rede contrátil de actina-miosina. Foi visto que PAR3 regula o tempo de contração, enquanto que PAR6 e aPKC regulam o intervalo da contração (David et al., 2010; Tepass, 2012).

Em conjunto, estes dados ressaltam a importância das proteínas PAR em diversos eventos de polarização, e torna-as importantes candidatas à regulação da segregação e manutenção de componentes intracelulares durante o alongamento apico-basal do placóide do cristalino

1.5 Função da Proteína PAR3 na polarização

PAR3 tem função central no estabelecimento das junções intercelulares e tem sido proposto como iniciador da ligação do complexo PAR à membrana apical. No estabelecimento da polaridade em *Drosophila* foi demonstrado que a localização de PAR3 na região apical pode ser independente de PAR6 e aPKC. PAR6 e aPKC dependem da presença de PAR3 para se localizarem apicalmente (Harris, Peifer, 2005). Juntos, estes dados sugerem que PAR3 regula a polaridade celular a montante de PAR6 e aPKC.

Em neuroepitélio de embrião de galinha e camundongo, PAR3 se localiza no nível das junções oclusivas, num domínio subapical em relação a aPKC/PAR6 (Afonso, Henrique, 2006, Manabe et. al., 2002). A superexpressão de PAR3 neste modelo experimental forma agregados ectópicos ao longo da membrana lateral e

recruta as proteínas PAR6, aPKC e beta-catenina. Nesse caso é como se PAR3 estivesse iniciando pontos de polarização ectópicos ao longo da membrana basolateral. A geração destes pontos ectópicos resulta em aumento anormal de adesividade intercelular, que tem consequências deletérias na capacidade migratória das células do tubo neural. Como, no tubo neural, as divisões celulares ocorrem próximas ao lúmen, a consequência final é que os precursores neurais não conseguem chegar ao lúmen para se dividir (Afonso, Henrique, 2006). Esses dados mostram que PAR3 sozinho é suficiente para o recrutamento e localização de proteínas de membrana durante a polarização celular.

PAR3 também possui papel na organização do citoesqueleto em eventos de polarização celular. A inibição da expressão PAR3 no epitélio retiniano, rompe a continuidade do anel de actina na região apical (Wei et al., 2004). Em células MDCKs no modelo experimental de reestabelecimento de polaridade, o anel de actina (cinturão apical) se organiza ao longo do contorno membranar apical da célula. Com a inibição da expressão de PAR3, o citoesqueleto de actina no domínio apical deixa de ser organizado e consequentemente não se reestabelece o cinturão de actina na periferia celular (Chen, Macara, 2005).

PAR3 também está envolvido com a dinâmica de citoesqueleto de células em migração, possivelmente através da regulação da proteína Rac1, GTPase importante para a formação de lamelipódios e regulação da polimerização de filamentos de actina. Especificamente, PAR3/Cdc42/PAR6/aPKC pode se ligar à Tiam1/Tiam2, uma GEF (guanine nucleotide exchange factors) de Rac1 que troca GDP por GTP, e ativar Rac1. Além disto, PAR3 é alvo de um efetor de Rho GTPase (ROCK), que fosforila e ativa a rede contrátil de actina-miosina. No domínio de ligação do PAR3 ao aPKC, existe um resíduo (T833 de rPAR3) que é alvo de ROCK e sua fosforilação leva à dissociação de PAR3 do complexo Cdc42/PAR6/aPKC, mas mantém a ligação de PAR3 à Tiam1/Tiam2. Nesta situação, PAR3 desacoplado do restante do complexo, sequestra Tiam1/2 e impede a ativação de Rac1. A proteína PAR3 fosforilada é encontrada na frente de migração da célula, na região central e traseira da célula. Essa localização sugere que a fosforilação de PAR3 seja importante para modular a atividade de Rac1, em consequência, a polimerização de actina em momentos específicos da migração celular (Figura 6, Nakayama et al., 2007).

Figura 6: Fosforilação de PAR3 por ROCK em células migratórias. Na frente de migração das células PAR3 forma um complexo com Tiam e aPKC/PAR6 e ativa Rac1. Na parte traseira da célula, ROCK fosforila PAR3 e PAR3/Tiam se dissociam do complexo aPKC/PAR3 e deixa de ativar Rac1. Em vermelho: rede de actina-miosina.

A regulação negativa de Rac1 por PAR3 é importante para a localização do cinturão apical de actina em células MDCK e reorganização de junções oclusivas (Chen, Macara, 2005). A inibição da expressão PAR3 desfaz as junções oclusivas, desfaz o cinturão apical de actina e resulta na ativação constitutiva de Rac1. A inibição de Rac1 ou Tiam1 leva a restauração das junções mesmo com baixos níveis de PAR3. Além disso, a restauração dos níveis de PAR3 retornar o nível de atividade de Rac1 para o normal. Esses dados sugerem que PAR3 possa estar agindo a montante de Rac1 para regular o estabelecimento do cinturão de actina apical.

A importância de PAR3 nas mudanças do citoesqueleto e sua função no estabelecimento da polaridade celular nos levou a investigar sua contribuição no recrutamento apical e organização dos filamentos de actina durante o alongamento apico-basal das células da ectoderm pre-placoidal para formar o placóide do cristalino.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Baseados nos dados anteriores de que os filamentos de actina e miosina segregam assimetricamente para a região apical do placóide do cristalino e que essa segregação forma uma rede contrátil no domínio apical importante para a invaginação do placóide (Borges et al., 2011), propusemo-nos a investigar que elementos poderiam regular essa polarização de actina apical. Sabendo-se que as proteínas do complexo PAR estão envolvidas em diversos eventos de polarização, nós investigamos o papel das proteínas PAR na polarização e recrutamento de actina apical no placóide do cristalino. Com base nessas informações, os objetivos desse trabalho foram:

- I) Caracterizar as proteínas de junções celulares e citoesqueleto de actina antes e após o alongamento do placóide.
- II) Caracterizar o padrão de expressão das proteínas PAR3, PAR6 e aPKC antes e após o alongamento do placóide.
- III) Verificar a importância da formação do complexo PAR3/PAR6/aPKC para a polarização de actina no placóide do cristalino.
- IV) Verificar a importância da GTPase Cdc42, ativadora do complexo PAR, através da utilização do seu dominante negativo, na polarização do placóide do cristalino.
- V) Verificar a função de PAR3 através de sua superexpressão e da superexpressão de proteínas mutadas de PAR3.

Para abordar aos objetivos I e II, os embriões foram imunomarcados com anticorpos específicos para cada proteína ou marcados para actina.

Para abordar aos objetivos III, IV e V, os embriões foram eletroporados com os plasmídeos contendo a sequência de proteínas truncadas de PAR6 e aPKC, do dominante negativo de Cdc42, do PAR3 selvagem e de seus mutantes; e a análise do fenótipo foi feita por meio de imunofluorescência para cada proteína e marcação para actina

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Obtenção dos embriões de galinha*

Os ovos fertilizados de galinha da raça White Leghorn foram adquiridos da Granja Kunitomo, situada na cidade de Mogi das Cruzes, São Paulo e da granja da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Os ovos foram incubados a 37 °C e 50 % de umidade relativa do ar por 40 a 53 horas para se obter embriões com o cristalino em diferentes estágios de desenvolvimento como indicado na tabela abaixo (de acordo com Hamburger, Hamilton, 1951)

Tabela 2: Estádios embrionários e tempos de incubação

Ectoderme pré-placoidal	HH11/12	40h - 49h de incubação
Placóide do cristalino	HH13	48h - 52h de incubação
Placóide invaginando	HH14	50h -53h de incubação

3.2 *Coleta dos embriões de galinha*

O ovo foi aberto cuidadosamente em um prato para não romper a gema. A coleta foi feita com o auxílio de papel-filtro, cortado em quadrados de 2,5 cm de aresta e com um orifício central em forma de cruz “+”. O papel-filtro foi colocado sobre a gema posicionando os orifícios do papel-filtro sobre o embrião, desta maneira, o embrião fica aderido através das membranas vitelínicas e extra-embrionárias. Com o auxílio de uma tesoura, a membrana vitelínica foi recortada em torno do papel-filtro e com uma pinça, o papel-filtro foi retirado em ângulo agudo em relação à superfície da gema para não desgrudar as membranas do papel. O embrião e as membranas aderidas ao papel-filtro foram transferidos para uma placa de Petri contendo PBS 1 x (solução salina tamponada com fosfato) para a remoção do excesso de vitelo. Os embriões foram lavados cuidadosamente em solução de PBS 1 x e mantidos em gelo até que todos os embriões fossem coletados (protocolo baseado em Chapman et al., 2001)

MATERIAL E MÉTODOS

3.3 Obtenção dos cortes congelados

Após a coleta, os embriões foram dissecados em solução salina tamponada com fosfato¹ (PBS 1 x) e as cabeças foram seccionadas na altura do coração. Os explantes cefálicos foram fixados em paraformaldeído (Sigma-Aldrich, São Paulo, S.P., Brasil) 2 % diluído em PBS 1 x por 30 min, lavados 3 x de 10 minutos cada em PBS 1 x, transferidos para uma solução de sacarose 20 % em PBS (solução de crioproteção) e mantidos a 4 °C por 1 h. Os explantes cefálicos foram incluídos em solução de OCT (Tissue-Tek® - Sakura Finetek, U.S.A.) - Sacarose 20 % na proporção de 1:1. O OCT foi adicionado a um molde plástico (Polysciences, inc., Warrington, PA, U.S.A) até preenchê-lo, o molde foi transferido para um suporte de metal apoiado em gelo seco para solidificar apenas o OCT-Sacarose do fundo. Nesse momento, o molde com OCT:sacarose foi removido do gelo seco e o embrião foi posicionado no bloco de OCT-Sacarose com um estereomicroscópio. O molde contendo o embrião foi reposicionado no suporte de metal para completar o congelamento da solução. Os blocos que não foram cortados após a inclusão ficaram estocados à -80 °C (por no máximo 1 ano). Os cortes foram feitos em criostato à 25 °C com 10µm de espessura, colocados em lâminas gelatinizadas², secados por 20min a 37 °C e estocados a -20 °C (no máximo por 2 ou 3 meses).

3.4 Imunofluorescência

As lâminas, com os cortes histológicos, foram retiradas do congelador, secadas por 20 min a 37 °C e fixados com paraformaldeído 4 % em PBS 1 X por 30 min a 4 °C. Após a fixação, foram feitas três lavagens de 10min com PBS 1 x para remover o excesso de fixador. Os cortes foram bloqueados com NGS (soro normal de cabra) 3 %, BSA (Albumina sérica de bovinos) 1 % e PBST 0,1 % (PBS contendo 0,1 % de Triton X-100), por 1 h a temperatura ambiente em câmara úmida. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio e foram aplicados sobre

¹ PBS (Phosphate Buffered Saline): Na₂HPO₄ 0,61 g/L, NaCl 8 g/L, H₂PO₄ 0,2 g/L, KCL 0,2 g/L; pH 7,2.

² As lâminas gelatinizadas com uma solução contendo 6g de gelatina em pó, 600ml de água destilada e 600mg de sulfato de cromo e potássio.

MATERIAL E MÉTODOS

os cortes *overnight* à temperatura ambiente e em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados foram listados na tabela abaixo:

Tabela 3: Anticorpos primários

Anticorpos Primários	Produzido em:	Empresa e número de catálogo	Diluição
Anti-PKC ι	Camundongo	BD Biosciences, no. 610175	1:100
Anti-PKC ζ/λ	Coelho	Cell Signalling, no. C24E6	1:700
Anti-ARP3	Camundongo	Sigma, no. A5979	1:200
Anti-beta-catenina	Camundongo	BD Biosciences, no. 610153	1:100
Anti-pan-cadherin	Coelho	Zymed Laboratories, no.71-7100	1:100
Anti-GFP	Camundongo	Molecular Probes, no. A11120	1:200
Anti-GFP	Coelho	Molecular Probes, no. A6455	1:500
Anti-myc	Camundongo	Invitrogen, no. R950-25	1:200
Anti-myc	Coelho	Cell Signaling Technology, 71D10	1:200
Anti-PAR3	Coelho	Millipore, no. 07-330	1:100
Anti-ZO-1	Camundongo	Molecular Probes, no. 339100	1:100
Anti-ZO-1	Coelho	Invitrogen, no. 617300	1:100
MARK2	Cabra	ABCAM, no. ab77641	1:50
MARK2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, no. sc-46607	1:50
MARK2	Coelho	Cell Signaling Technology, no. #9118	1:50

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas 3 x de 10min cada com PBS 1 x e incubadas, em câmara úmida e escura, em

MATERIAL E MÉTODOS

temperatura ambiente por 2 h, com anticorpos secundários e marcadores de citoesqueleto, núcleo e/ou membrana diluídos em PBS 1 x. Os anticorpos secundários e marcadores foram listados na tabela abaixo:

Tabela 4: Anticorpos secundários e marcadores fluorescentes

Anticorpos secundários ou marcadores	Produzido em:	Empresa e número de catálogo	Diluição
Anti-coelho conjugado Alexa 488	Cabra	Molecular Probes, no. A11008	1:500
Anti-camundongo conjugado ao Alexa 488	Burro	Molecular Probes, no. A21202	1:500
Anti-camundongo conjugado ao TRITC	Cabra	Zymed, no.81-6514	1:50
Anti-coelho conjugado ao TRITC	Cabra	Sigma, no.T6778	1:50
Rhodamine-phalloidin	-	Molecular Probes, no.R415	1:50
Vybrant DIO	-	Invitrogen, no V22886	1:50
DAPI	-	Sigma	1:1000

Os cortes histológicos foram montados em Vecta Shield (Vector Laboratories, USA) e analisados no microscópio confocal Zeiss LSM 510 e no confocal multifóton Zeiss LSM-780 NLO (CEFAP, ICB-USP, FAPESP 2009/53994-8).

MATERIAL E MÉTODOS

3.5 Eletroporação *in ovo*

A eletroporação *in ovo* foi realizada em embriões no estágio de ectoderma pré-placoidal (HH9/HH10), estágio anterior ao alongamento do placóide. Para esterilização externa foi aplicada solução de 70 % etanol sobre a casca do ovo. Em seguida, o ovo foi posicionado com seu eixo maior na posição horizontal. Com o auxílio de uma agulha e seringa, a casca foi furada na região mais pontiaguda do ovo e foram retirados 3 ml de albumina para afastar o embrião da casca. Com uma fita larga cobriu-se o eixo maior do ovo e a abertura feita pela agulha. Em seguida, foi aberta uma janela de 1,5 cm de diâmetro na casca para a observação do embrião. Com o intuito de contrastar o embrião, uma solução estéril de Nankin 10 % em solução Ringer's foi injetada sob ele. Uma abertura foi feita na membrana vitelínica próxima ao ectoderma pré-placoidal do olho direito e o embrião foi banhado com solução de Ringer's. Os eletrodos foram posicionados a uma distância de 4 mm um do outro e com o polo negativo próximo ao olho direito e o polo positivo próximo ao olho esquerdo. A solução de plasmídeo contendo o traçador inerte FastGreen a 0,1 % (Sigma-Aldrich, São Paulo, S.P., Brasil) foi injetada na região externa próxima ao ectoderma pré-placoidal direito. Concomitante com a injeção, o eletroporador foi acionado para liberar 5 pulsos de 9 V, com duração de 50 ms e intervalos de 100 ms entre eles. Com o objetivo de transfectar as células que originarão o cristalino, o polo negativo foi posicionado perto do ectoderma do olho direito para que o plasmídeo migrasse em direção contrária (em direção ao polo positivo). Os ovos foram fechados com fita adesiva e reincubados por aproximadamente 16 h. Os embriões foram coletados, cortados em criostato e os cortes processados para imunofluorescência como descrito anteriormente.

3.6 Clones e respectivos plasmídeos utilizados na eletroporação

A sequência da proteína de PAR-6 de *Gallus gallus* foi obtida no banco de dados do NCBI (NM_001044641.1). A partir dessa sequência, foram desenhados primers (Apêndice 1) que continham a sequência da proteína Myc-tag para a clonagem por PCR das proteínas truncadas de PAR6 [Myc::cPAR6(1-126), Myc::cPAR6(127-370) e Myc::cPAR6(155-370)] (Figura 7). A clonagem foi feita a partir do cDNA de *Gallus gallus*, os embriões foram coletados nos estádios HH12/13

MATERIAL E MÉTODOS

e macerados em Trizol (Life Technologies Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil) para a extração do RNA total desses embriões, através da reação com a enzima transcriptase reversa pelo kit SuperScript (Life Technologies Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), o DNA foi sintetizado a partir do RNA (cDNA) e o cDNA foi utilizado como molde para a amplificação por PCR.

Primeiramente as proteínas truncadas foram amplificadas por PCR utilizando primers específicos para cada sequência (Apêndice 1). O amplicon foi inserido num vetor PGEM-T (Promega Biotecnologia do Brasil Ltda., São Paulo, S.P., Brasil), no qual foram adicionadas nas suas extremidades 3' uma sequência de timidinas, essa adição melhora a ligação do produto de PCR ao vetor. A presença do amplicon foi confirmada por sequenciamento. O inserto então, foi retirado do PGEM-T através da digestão com as enzimas de restrição XbaI e BamHI e subclonado no vetor pMES (dado gentilmente pela Dra. Marianne Bronner, Swartz et al., 2001) que contém o GFP após uma sequência IRES (Internal Ribosomal Entry Site) dirigida pelo promotor de beta-actina, e é um dos plasmídeos padrão utilizado no laboratório para superexpressão embrionária. A concentração dos clones truncados de PAR6 para a eletroporação do ectoderma pré-cristalino foi de 3 µg/µl.

O clone de aPKC sem os primeiros 47 aminoácidos (aPKCΔN47, Figura 7), foi gentilmente doado pelo Dr. Shigeo Ohno, Universidade Escola de Medicina de Yokohama, Japan, no vetor SRD (Akimoto et.al., 1994). A sequência do aPKCΔN47 foi clonada por PCR, utilizando-se primers para a proteína aPKC de rato (Anexo 1), fusionada à HA e inserida no plasmídeo de expressão pMES para os ensaios de eletroporação, a concentração do plasmídeo para a eletroporação do ectoderma pré-cristalino foi de 3,2 µg/µl.

Os clones das proteínas PAR3 de *Gallus gallus* fusionados à GFP (cPAR3::GFP) (2,5 µg/µl), Par6 de *Gallus gallus* fusionado à GFP (GFP::cPAR6) (0,1 µg/µl) e PAR3 sem o domínio CR1 da região N-terminal fusionado à GFP (cPAR3ΔN::GFP, correspondendo a deleção dos primeiros 228 aminoácidos de PAR3) (2,5 µg/µl) no plasmídeo PCAGGS foram gentilmente cedidos por Dr. Domingos Henrique (Afonso, Henrique, 2006). Os clones de PAR3 com a troca do aminoácido treonina pela alanina ou aspartato e fusionados à Myc [(Myc-rPAR3T833A (2,5 µg/µl) e Myc-rPAR3T833D (2,5 µg/µl)] inseridos no plasmídeo PCAGGS foram gentilmente cedidos por Dr.Kozo Kaibuchi (Nakayama et al., 2008). Os embriões controle das eletroporações dos clones acima citados foram

MATERIAL E MÉTODOS

transfectados com o plasmídeo pMES sem inserto mas contendo a sequência para a proteína GFP.

Figura 7: Proteínas truncadas de PAR6 de *Gallus gallus* Primeiro esquema: domínios de PAR6 completo. PAR6(1-126): domínio de ligação ao aPKC. PAR6(127-370): domínio de ligação ao Cdc42 e PAR3. Par6(155-370): domínio de ligação ao PAR3.

A construção da proteína fusão VSVG::Myc::DNCdc42 foi feita através de PCR a partir da sequência da proteína DNCdc42 (dominante negativo do Cdc42 de humanos, NM_001039802.1), doada pelo Prof. Fabio Forti (IQ, USP). Foram desenhados primers que continham a sequência do epítipo Myc-tag (um polipeptídeo derivado do gene c-myc. A sequência de aminoácidos do Myc-tag é: EQKLISEEDL) para a clonagem por PCR do DNCdc42 (Apêndice 1). O amplicon foi inserido num vetor PGEM-T (Promega Biotecnologia do Brasil Ltda., São Paulo, S.P., Brasil) e transformado em bactérias. A presença do amplicon foi confirmada por sequenciamento. O inserto, então, foi retirado do PGEM-T através da digestão com as enzimas de restrição XbaI e ECORI e subclonado no vetor pMES. A clonagem da proteína VSVG foi realizada por PCR com primers (Apêndice 1) para a sequência do VSVG inserido no plasmídeo pCMV (Addgene), após a amplificação do inserto flanqueado pela enzima de restrição XBAI, a sequência do VSVG foi inserida no vetor pGEM-T. Tanto o pGEMT quanto o plasmídeo pMES, contendo a sequência da proteína Myc::DNCdc42, foram digeridos com XBAI. O VSVG retirado do pGEM-T foi inserido no plasmídeo de expressão pMES, no sítio de restrição da enzima XBAI antes do sítio de EcoRI onde está inserida a proteína Myc::DNCdc42 (Figura 8). A clonagem foi verificada por sequenciamento. A concentração do Myc::DNCdc42 e do VSVG::Myc::DNCdc42 para a eletroporação no ectoderma pré-cristalino foi de 2,5 µg/µl. Foram realizados três experimentos independentes para cada clone.

MATERIAL E MÉTODOS

Fusão da proteína Myc ao Cdc42 via PCR. Inserção do Myc::DNCdc42 no plasmídeo pmes

Digestão com XBAI

Digestão do pmes com XBAI para ligar a sequência do VSVG ao pMES com Myc::DNCdc42

Clonagem do VSVG por PCR

Verificação por sequenciamento

Figura 8: Esquema mostrando como foi feita a clonagem do DNCdc42. A proteína Myc::DNCdc42 flanqueada pelas enzimas de restrição XBAI e EcoRI foi clonada e inserida no plasmídeo pMES. Após a digestão do plasmídeo com a enzima XBAI, o VSVG, já clonado e flanqueado pela enzima de restrição XBAI, foi inserido nesse sítio.

3.7 Quantificação da intensidade de fluorescência

A intensidade de marcação de actina, ARP3, myc e GFP foi obtida usando o software Image J v1.43 (NIH). As imagens originais obtidas (300 dpi) em confocal foram importadas no software Image J e um retângulo foi desenhado na região do ectoderma, placóide ou ectoderma não placoidal. As dimensões da área delimitada foram ajustadas no comprimento apico-basal e a intensidade da fluorescência para todos os pixels nesta área delimitada foi tabulada relativa à distância apico-basal. Para o maior valor de intensidade nesta região, foi atribuído o valor 100 (intensidade absoluta) e os outros valores menores foram padronizados como uma fração desse valor. Os valores de intensidade foram normalizados relativo ao maior valor com o

MATERIAL E MÉTODOS

objetivo de obter informação sobre as mudanças apico-basais de cada marcador analisado. As quantificações são a representação de pelo menos três experimentos independentes.

3.8 Cultivo, transfecção e ensaio de cálcio em células MDCKs

As células de rim de caninos, Mardin Darby Canine kidney (MDCK), foram plaqueadas numa placa de 24 poços em lamínula de vidro (6×10^4 células por poço). O meio utilizado foi DMEM com 10 % FBS e 1 % penicilina/estreptomicina. Após a confluência (1-2 dias), as células foram transfectadas com as proteínas truncadas de PAR6 ou aPKC. As células foram transfectadas com 1 μ g de DNA e 2 μ l de lipofectamina 2000 (Life Technologies Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil) por 4 h em meio sem adição de soro e antibióticos. Após as 4 h, as células foram lavadas 3 x com meio DMEM+FBS, depois das 3 lavagens, foi adicionado meio DMEM/FBS/antibiótico e as células ficaram na estufa por mais 22 h (Figura 8). No dia seguinte, as células foram lavadas 2 x com PBS estéril e incubadas em meio LCM (low calcium medium, MEM³, Life Technologies Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), meio com baixa quantidade de cálcio, por 22 h, com o intuito de desestabilizar as junções oclusivas (Figura 9). Após as 22 h, o meio LCM foi trocado pelo meio DMEM com maior concentração de cálcio (1,8 mM), as células foram fixadas em tempos diferentes: 0 h, 3 h e 6 h após a troca do meio LCM pelo DMEM (Figura 9) e imunomarcadas para ZO-1 e para a proteína Myc ou HA, para detecção das proteínas truncadas de PAR6 ou aPKC fusionadas respectivamente a estes epítomos. A imunofluorescência foi feita como descrito anteriormente.

³ MEM (Minimum Essential Medium): Contém Earle's salts e Phenol Red, mas não possui Cálcio, L-glutamina e HEPES.

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 9: Esquema do ensaio de cálcio em células MDCKs. Inicialmente as células são transfectadas e após 4 h de transfecção, o meio das células é trocado e elas são incubadas por 22 h. Após as 22 h o meio é trocado pelo meio LCM (Low calcium medium) e as células são novamente incubadas por 22 h nesse meio para desestabilizar as junções celulares. Após as 22 h, o meio é trocado novamente e as células são fixadas em 0 h, 3 h ou 6 h após a adição do meio DMEM.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1 Caracterização dos elementos de polarização apico-basal durante a embriogênese inicial do cristalino

4.1.1 Proteínas de junções celulares

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre um intenso remodelamento dos tecidos para formar estruturas específicas. Esse remodelamento tecidual requer mudanças em elementos intracelulares como junções célula-célula, proteínas de polarização e citoesqueleto.

Durante a morfogênese inicial do cristalino, estão envolvidos dois importantes processos de remodelamento tecidual, o alongamento apico-basal e a invaginação das células do placóide. O alongamento celular precede a invaginação das células do placóide, e nesse processo de alongamento, ocorrem modificações intracelulares importantes para a invaginação do tecido, como, por exemplo, crescimento no comprimento apico-basal da célula e polarização de proteínas do citoesqueleto. Neste trabalho, investigamos as modificações intracelulares durante o alongamento que serão importantes para as etapas posteriores do desenvolvimento do cristalino.

Com o intuito de caracterizar a dinâmica apico-basal dos componentes celulares durante o alongamento apico-basal do placóide, foi analisado o padrão de expressão de proteínas de junções celulares, citoesqueleto e proteínas de polarização.

Primeiramente, analisou-se o padrão de expressão da proteína ZO-1, presente em junções oclusivas, que é utilizada como marcador de domínio apical em epitélios polarizados e estabiliza a polarização apical separando o domínio apical do domínio baso-lateral. A imunofluorescência para ZO-1 e marcação com DIO, um marcador lipofílico (marca membranas celulares), mostrou que ZO-1 localiza-se no domínio apical no estágio de ectoderma pré-placoidal (Figura 10 A-A”) e no estágio de placóide (Figura 10 B-B”), sugerindo que o ectoderma pré-placoidal já é um epitélio polarizado antes mesmo do alongamento do placóide, apresentando um domínio apical definido com a presença de ZO-1.

As junções aderentes também possuem papel importante durante a morfogênese, uma vez que se localizam abaixo de ZO-1 e são responsáveis pelo

RESULTADOS

contato célula-célula, definem o eixo apico-basal, são importantes para a estabilização e formação de epitélios polarizados e para o ancoramento da rede cortical de actina-miosina (Baum, Georgiou, 2011; Lecuit, Lenne, 2007). No placóide em desenvolvimento, a proteína beta-catenina, proteína de junções aderentes, se distribui homogeneamente ao longo da membrana baso-lateral no estágio de ectoderma pré-placoidal, logo abaixo de ZO-1 (Figura 10 C'-C"). Com o alongamento do placóide há um enriquecimento da proteína beta-catenina na região apical, mas a localização no domínio lateral se mantém (Figura 10 D'-D"). Esses dados sugerem que o enriquecimento apical de beta-catenina durante o alongamento do placóide seja importante para permitir maior adesão célula-célula para o evento posterior ao alongamento, a invaginação do placóide.

RESULTADOS

Figura 10: ZO-1 se mantém apical e beta-catenina polariza para o domínio apical durante o alongamento do placóide. O ectoderma pré-placoidal (A, C) e placóide (B, D) foram imunomarcados para a proteína de junções oclusivas, ZO-1 (A-D; A''-D'') e junções aderentes, beta-catenina (C', C'', D', D'') e marcado com DIO para membrana celular (A'-A'', B'-B''). ZO-1 está localizado na região apical em todos os estádios analisados (A-D). A proteína beta-catenina está localizada ao longo da membrana apico-basal no ectoderma pré-placoidal (C', C'') e enriquece o domínio apical no estágio de placóide (D', D''), mas se mantém também no domínio baso-lateral. A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O ectoderma pré-placoidal (E) e placóide (P) estão localizados à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica está localizada à esquerda da linha pontilhada (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-D''. Barra de

RESULTADOS

4.1.2 Citoesqueleto de actina

Dados prévios do nosso laboratório mostraram que, durante o alongamento do placóide, a rede contrátil de actina-miosina se acumula na região apical e essa rede é importante para o evento de invaginação do placóide durante o desenvolvimento do cristalino (Borges et al., 2011). Com o objetivo de posicionar a actina em relação a outros elementos da porção mais apical do placóide, os filamentos de actina foram marcados com faloidina e as junções oclusivas foram imunomarcadas para ZO-1. No ectoderma pré-placoidal, os filamentos de actina estão distribuídos ao longo do domínio apico-basal, enquanto que ZO-1 se localiza apenas na região apical (Figura 11 A-A"). Quando o ectoderma pré-placoidal se alonga para formar o placóide do cristalino, um epitélio pseudoestratificado, há um acúmulo de actina no domínio de ZO-1 na região apical (Figura 11 B-B"), mostrando que os filamentos de actina estão presentes na porção mais apical do placóide do cristalino.

Durante o alongamento celular há um remodelamento das junções aderentes para a região apical. Como a actina pode se associar a junções aderentes, analisamos se a actina acompanha o remodelamento de beta-catenina durante o alongamento. O ectoderma pre-placoidal e placóide foram marcados com faloidina e imunomarcados para beta-catenina. No ectoderma pré-placoidal, os filamentos de actina estão presentes ao longo do eixo apico-basal, assim como a beta-catenina (Figura 11 C-C"). Com o alongamento do placóide, há o acúmulo das duas proteínas no mesmo domínio apical (Figura 11 D-D"), mostrando que o enriquecimento apical de actina acompanha o acúmulo apical de beta-catenina com o alongamento do placóide.

RESULTADOS

Figura 11: A actina polariza para o domínio apical durante o alongamento do placóide. O ectoderma pré-placoidal (A, C) e placóide (B, D) foram imunomarcados para a proteína de junções oclusivas, ZO-1 (A, B; A'', B'') e junções aderentes, beta-catenina (C', C'', D', D'') e marcado com faloidina para actina (A', A''; B', B''; C, C''; D, D''). ZO-1 está localizado na região apical nos estádios analisados (A, B). A actina está distribuída ao longo da periferia celular no ectoderma pré-placoidal (A', C) mas se acumula no domínio apical durante o alongamento do placóide (B', D). A proteína beta-catenina está localizada ao longo da membrana apico-basal no ectoderma pré-placoidal (C', C'') e enriquece o domínio apical juntamente com actina no estágio de placóide (D', D''). A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O ectoderma pré-placoidal (E) e placóide (P) estão localizados à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica está localizada à esquerda da linha pontilhada (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-D''. Barra de escala = 5µm.

RESULTADOS

Devido à grande importância da dinâmica de actina durante o alongamento do placóide, investigamos quais elementos poderiam estar envolvidos na polimerização de actina no placóide do cristalino. O complexo ARP2/3 é um nucleador de actina responsável pela polimerização de filamentos ramificados de actina (Welch, 1999). Uma das isoformas (ARPC2) foi identificada na região apical e basal do cristalino no estágio de placóide invaginando (Chauhan et al., 2011). Considerando que o complexo ARP seja um possível candidato à polimerização de actina na região apical, o padrão de expressão da proteína ARP3 foi analisado junto com a marcação para actina (Figura 12). No ectoderma pré-placoidal, a proteína ARP3 está distribuída ao longo do eixo apico-basal, assim como a actina (Figura 12 A-A", C). Com o alongamento do placóide, a proteína ARP3 acompanha a distribuição apical de actina (Figura 12 B-B"), co-localizando com ela na região apical (Figura 12 B-B", D), sugerindo que o complexo ARP seja um dos responsáveis pela polimerização de filamentos de actina na região apical do placóide.

É importante ressaltar que o rearranjo dos componentes celulares aqui relatados é particular das células que originarão o cristalino e não ocorre no epitélio adjacente ao placóide (o epitélio peri-placoidal) que se mantém com as mesmas características do ectoderma pré-placoidal, antes do alongamento celular.

RESULTADOS

Figura 12: A proteína ARP3 acompanha a distribuição de actina durante o alongamento do placóide. O ectoderma pré-placoidal (A-A'') e o placóide (B-B'') foram marcados para actina (A, B) e imunomarcados para ARP3 (A', B'). No ectoderma pré-placoidal, ARP3 co-localiza com actina e está distribuída ao longo do domínio apico-basal (A-A'', C). Com o alongamento do placóide, ambas as proteínas, ARP3 e actina, acumulam-se no domínio apical (B-B'', D). Os gráficos mostram a quantificação relativa dos valores dos pixels presentes nas áreas delimitadas. A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O ectoderma pré-placoidal (E) e placóide (P) estão localizados à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica está localizada à esquerda da linha pontilhada (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-B''. Barra de escala: 5µm.

RESULTADOS

4.1.3 Proteínas de polarização apical

Os dados anteriores mostraram que durante o alongamento do placóide há uma polarização apico-basal de beta-catenina e principalmente de actina. Baseados nesses dados, foram investigados possíveis candidatos que poderiam regular a polarização desses elementos citados.

Em diversos eventos de polarização apico-basal, várias proteínas de polarização estão envolvidas no controle da polaridade celular, através do recrutamento, ativação e inibição de outras proteínas (Macara, 2004).

As proteínas PAR são associadas a diversos eventos celulares durante o desenvolvimento embrionário e durante o estabelecimento da polaridade apico-basal em epitélios (Suzuki, Ohno, 2006). Em epitélios polarizados as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC formam um complexo na região apical, enquanto que a proteína PAR1 se localiza no domínio apico-basal (Suzuki, Ohno, 2006).

Se as proteínas PAR são responsáveis pela polarização celular em diversos contextos celulares, então elas podem ter papel na polarização dos elementos celulares durante o alongamento do placóide do cristalino. Durante o desenvolvimento embrionário de *C. elegans* e *Drosophila*, as proteínas PAR3/PAR6/aPKC segregam assimetricamente para a região anterior definindo a polarização do eixo-antero-posterior desses animais, além disso, elas segregam assimetricamente para a região apical na definição do eixo apico-basal durante o estabelecimento do epitélio de *Drosophila* (St Johnston, Alringer, 2010; Suzuki, Ohno, 2006). Para verificar se as proteínas PAR estão presentes nesse tecido em desenvolvimento e se elas polarizam juntamente com a actina e beta-catenina para o domínio apical durante o alongamento do placóide, foi realizada imunomarcação para PAR3, aPKC e GFP, para localizar PAR6 nos estádios de ectoderma pré-placoidal e placóide. A proteína PAR3 localiza-se apicalmente no ectoderma pré-placoidal (Figura 13 A-A'') e se mantém no domínio apical com o alongamento do placóide (Figura 13 B-B''), em ambos os estádios, PAR3 se encontra no domínio da proteína ZO-1 (Figura 13 A'', B''). Tanto a presença de aPKC quanto a de PAR6 foi detectada na região apical nos dois estádios mencionados acima (Figura 13 C-F''), no entanto, elas parecem estar em um domínio acima da proteína ZO1 (Figura 13 C'', D'', E'', F'').

RESULTADOS

Figura 13: O complexo PAR está presente no domínio apical do ectoderma pré-placoidal e do placóide. O ectoderma pré-placoidal (A-A"; C-C"; E-E") e o placóide (B-B"; D-D", F-F") foi imunomarcado por ZO-1, PAR3, aPKC e GFP (em embriões eletroporados com GFP::cPAR6). PAR3, aPKC e PAR6 estão no domínio apical no estágio de ectoderma pré-placoidal (A'-A", C'-C" e E'-E", respectivamente) e mantém a distribuição apical no estágio de placóide (B'-B", D'-D" and F'-F"). A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O ectoderma pré-placoidal (E) e placóide (P) estão localizados à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica está localizada à esquerda da linha pontilhada (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-F". Barra de escala (A-F and A'-F'): 5µm. As imagens A"-F" são aumentos das áreas delimitadas em A-A', B-B', C-C', D-D', E-E' e F-F'. Barra de escala: 1µm.

A localização em domínios diferentes das proteínas PAR foi confirmada com a imunomarcagem entre as proteínas do complexo PAR apical. PAR6 e aPKC se localizam em um subdomínio acima de PAR3 no estágio de ectoderma pre-placoidal (Figura 14 A, C) e no estágio de placóide (Figura 14 B, D). Enquanto que PAR6 e aPKC localizam-se no mesmo domínio apical em ambos os estádios (Figura 14 E, F). Essa sub-localização das proteínas PAR apicais também ocorre em neuroepitélio de embrião de galinha, em epitélio polarizado de embriões de invertebrados e em epitélios de mamíferos (Afonso, Henrique, 2006, Chen, Zang, 2013; Harris, Peifer, 2005).

Com o presente trabalho, demonstrou-se que o ectoderma pré-placoidal é um epitélio polarizado antes mesmo do alongamento do placóide com a presença de ZO-1 definindo a região apical. O padrão de expressão das proteínas do complexo PAR apical, corrobora com a ideia de que o estabelecimento da polaridade ocorre antes mesmo do alongamento do placóide pois as proteínas PAR encontram-se na região apical desde o estágio de ectoderme pré-placoidal.

Figura 14: As proteínas PAR estão localizadas em diferentes subcompartimentos. As imagens são aumentos da membrana apical (G, H) nos estádios de ectoderma pré-placoidal (A, C, E) e placóide (B, D, F) após imunomarcção para PAR3, GFP (PAR6) e aPKC. Em ambos os estádios, as proteínas PAR estão próximas umas das outras no domínio apical (A-F), mas PAR6 e aPKC co-localizam (E and F) em um domínio apical acima de PAR3 (A-D). A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. Ectoderma pré-placoidal (E). Placóide (P) Barra de escala: 1µm.

RESULTADOS

4.1.4 Proteína de polarização baso-lateral

A localização apical de PAR3, PAR6 e aPKC no domínio apical depende de outras proteínas de polarização, como a proteína PAR1. A inibição mútua entre as proteínas do complexo PAR apical e PAR1 faz com que cada proteína se mantenha polarizada em domínios específicos na célula. A proteína PAR1 (também conhecida como MARK-2), localiza-se na região baso-lateral em epitélios polarizados e sua atividade e associação à membrana basolateral precede e é necessária para a organização e estabilização de microtúbulos durante as fases iniciais de polarização (Bohm et al., 1997; Cox et al., 2001; Doerflinger et al., 2003). Com o intuito de verificar se PAR1 está presente no ectoderma e placóide do cristalino e se possui o padrão de expressão baso-lateral encontrado em outros tipos de epitélios, as células foram imunomarcadas para a proteína PAR1/MARK-2 antes e depois da formação do placóide do cristalino.

Como não existiam anticorpos para PAR1 de galinha disponíveis, a escolha destes anticorpos foi baseada na conservação filogenética do epítipo utilizado para gerar o anticorpo. Desta forma, foram testados 3 anticorpos comerciais para PAR1/MARK-2 de 3 empresas diferentes, ABCAM (ab77641, corresponde à sequência dos aminoácidos 499-509 de MARK-2 de humanos, NP_001034557.1), Cell signaling (#9118, corresponde aos resíduos próximos à Lys430 de MARK2 de humanos) e Santa Cruz Biotechnology (sc-46607, correspondente à uma região próxima à região C-terminal de MARK-2 de humanos). Destes 3 anticorpos, apenas o da Santa Cruz marcou as células analisadas. A marcação encontrada foi apenas no núcleo das células (Figura 15), o que é inconsistente com os relatos da literatura de que a proteína está presente próxima à membrana baso-lateral das células (Bohm et al., 1997; Cohen et al, 2004).

RESULTADOS

Figura 15: O padrão de expressão de PAR1 é nuclear. Imunofluorescência para MARK2 (Santa Cruz Biotechnology), nos estádios de ectoderma pré-placóide e placóide. Região à direita da linha branca, ectoderma pré-placoidal (E) ou placóide do cristalino (P). Região à esquerda da linha branca, vesícula óptica (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras.

Visto que não havia acesso a anticorpos para a detecção inequívoca de PAR1 em embrião de galinha, o próximo passo foi buscar no banco de dados de *Gallus gallus* do NCBI a proteína PAR1 com o objetivo de clonar o gene e seguir diretamente para ensaios funcionais. No banco de dados, não foi encontrada a proteína MARK-2 no genoma de galinha, apenas outras proteínas da família das MARKs. Foi alinhada a sequência de PAR1 (AAA97437.1) de *C. elegans*, a fim de identificar possíveis ortólogos da proteína PAR1 em galinha. Foram encontradas 3 MARKs diferentes, a MARK3 isoforma 2 (XM_421385.2), MARK3 isoforma 1 (XM_001234618.1) e MARK1 (XM_419403.2), com algumas regiões semelhantes à PAR-1. A proteína PAR1 de *C. elegans* se assemelha às 3 MARKs encontradas nos primeiros 484 aminoácidos (76 %), nos 992 – 1192 aminoácidos com 45 % de semelhança com a proteína MARK3 isoforma 2, 82 % com a MARK3 isoforma 1 e 49 % com a MARK1. Além disso entre as MARKs de galinha há muitas semelhanças, não sendo possível caracterizar se todas ou só uma delas tem o papel semelhante à

RESULTADOS

proteína PAR1 caracterizada em *C elegans* (Apêndice 2). Devido às dificuldades em caracterizar PAR1, optou-se, então, por avaliar apenas o papel do complexo PAR apical na polarização das células do cristalino.

4.2 Interação do complexo par apical no recrutamento de actina

Embora as proteínas do complexo PAR apical estejam presentes em subdomínios diferentes, não significa que elas não estejam interagindo. Além disso, por serem proteínas de polarização e estarem presentes na região apical do cristalino em desenvolvimento, elas podem ter papel importante no recrutamento de actina apical durante o alongamento do placóide. O papel das proteínas do complexo PAR no recrutamento de actina no domínio apical do placóide pode depender da interação das proteínas do complexo ou não.

Para testar se a interação do complexo PAR é importante para o recrutamento de actina, interferiu-se com os elementos do complexo PAR através da superexpressão de proteínas truncadas de PAR6 e aPKC. Primeiramente foram clonadas proteínas truncadas de PAR6 que possuem domínios bem conhecidos de interação com as outras proteínas do complexo e um domínio de ligação à GTPases que é responsável pela ativação do complexo.

As proteínas truncadas utilizadas foram:

- a) Apenas o domínio PB1 de ligação ao aPKC [Myc::PAR6 (1-126)] (Figura 16).
- b) O domínio semi-CRIB (interação com a GTPase Cdc42) mais o domínio PDZ (interação ao PAR3) até o final da região C-terminal [Myc::PAR6(127-370)] (Figura 16).

A expectativa com a superexpressão da forma truncada de PAR6 (1-126), por exemplo, é de que ela se ligue ao aPKC endógeno e não permita a ativação por Cdc42 e nem se ligue ao PAR-3 por não possuir os domínios CRIB e PDZ, respectivamente. Enquanto que a superexpressão de PAR6 (127-370) deveria se ligar ao PAR3 endógeno, mas não ao aPKC.

RESULTADOS

Figura 16: Proteínas truncadas de PAR6 e aPKC. PAR6 (1-126) possui apenas o domínio PB1 de PAR6 e PAR6 (127-370) não possui o domínio PB1. aPKC Δ N47 não possui os primeiros 47 aminoácidos correspondentes ao domínio PB1 de aPKC. Domínios desenhados baseados em Macara. 2004.

As proteínas truncadas a partir da sequência de PAR6 de *Gallus gallus* foram clonadas e fusionadas à proteína Myc inseridas no plasmídeo de expressão pMES e eletroporadas no estágio de ectoderma pré-placoidal, antes do alongamento do placóide, portanto antes do acúmulo apical de actina. Os cortes histológicos foram marcados com faloidina para a localização de filamentos de actina e imunomarcados para Myc para a localização das proteínas truncadas. As proteínas truncadas de PAR6 [PAR6(1-126) e PAR6(127-370)] não inibiram o acúmulo de actina apical nas células eletroporadas durante o alongamento do placóide (Figura 17, setas).

A proteína aPKC, outro componente do complexo PAR, possui um domínio regulatório, PB1, que é responsável por sua interação com PAR6 e um domínio catalítico, responsável por sua interação com PAR3 (Figura 16). Foi visto que a proteína aPKC sem os primeiros 47 aminoácidos (aPKC Δ N47, figura 16), não interage com a proteína PAR6 (Suzuki et al., 2001). Com o intuito de investigar se a ligação de PAR6 com aPKC é importante para o recrutamento de actina apical, os embriões foram eletroporados com a sequência do HA::aPKC Δ N47 no ectoderma

RESULTADOS

pré-cristalino e analisados no estágio de placóide do cristalino. Foi feita imunofluorescência para HA para localizar a proteína aPKC λ Δ N47 e marcação para actina através da faloidina. Observou-se que a proteína HA::aPKC λ Δ N47 também não impediu o acúmulo de actina apical nas células placóide do cristalino eletroporadas (Figura 17).

Os dados obtidos a partir das proteínas truncadas de aPKC e PAR6 sugerem que o recrutamento de actina apical seja independente da interação do complexo ou que as proteínas truncadas não são capazes de alterar a polarização nas células do placóide.

Figura 17: As proteínas truncadas de PAR6 e aPKC não inibiram o acúmulo apical de actina. Eletroporação com Myc::PAR6 (1-126), Myc::PAR6 (127-370) e HA::aPKC Δ N47 no estágio de ectoderme pré-placoidal e imunomarcados em estágio de placóide com Myc ou HA (verde) e marcados com Actina (vermelho). O placóide (P) está localizado à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica (VO) está localizada à esquerda da linha pontilhada. Seta Branca: Actina apical em células eletroporadas. Os retângulos nos esquemas à esquerda delimitam a área

4.3 Interação do complexo par na manutenção e estabelecimento das junções celulares

Com o objetivo de distinguir se a utilização dos clones truncados eletroporados nas células precursoras do cristalino é uma forma eficaz de interferir com a função de PAR apical, ou se o complexo PAR apical não é relevante para a polarização de actina no placóide, analisou-se se as proteínas truncadas são capazes de alterar a polaridade em um outro paradigma celular, portanto os clones eletroporados em

RESULTADOS

embrião de galinha foram transfectados em células MDCK para analisar seu papel no *estabelecimento e manutenção* de junções.

Na literatura, diversos trabalhos utilizam as células MDCKs para estudar a função das proteínas PAR em eventos de polarização. As células MDCKs são células epiteliais com polaridade definida e possuem as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC na região apical. Trabalhos anteriores mostraram a função do complexo PAR em células MDCKs através da utilização de proteínas do complexo PAR truncadas. Os objetivos desses trabalhos foram interferir com a formação do complexo PAR apical e analisar o estabelecimento e manutenção das membranas celulares através da análise das junções oclusivas (Gao et al., 2002; Garrard et al., 2003; Suzuki et al., 2001).

Como os clones truncados não afetaram a polarização apical de actina, foi proposta a utilização das células MDCK para testar a eficiência das proteínas truncadas. Os clones que reduzissem a expressão de ZO-1 seriam utilizados para investigações mais aprofundadas no placóide cristalino. As células MDCKs foram transfectadas em monocamada com a sequência das proteínas truncadas de PAR6 e aPKC (Figura 16) e avaliou-se se elas eram responsáveis por interferir na localização de ZO-1 na região apical. A transfecção das formas truncadas não alterou o cinturão apical da proteína ZO1 que se manteve contínua entre as células, mostrando que as construções não alteraram a *manutenção* das junções apicais.

Para avaliar o papel das proteínas PAR no *estabelecimento* das junções, as células transfectadas foram cultivadas em meio com baixos níveis de cálcio, por 22 h. Esse procedimento é utilizado para desestabilizar as junções celulares e, quando as células são expostas a níveis fisiológicos de cálcio novamente (1,8 mM), as junções são reestabelecidas (Gumbiner, Simons, 1986, Figura 9 materiais e métodos). As células transfectadas não apresentaram alterações na velocidade ou extensão da sua capacidade de estabelecer junções (Figura 18). No tempo 0 h (células fixadas após tratamento com meio com baixo cálcio) as células controle e transfectadas reduziram as junções oclusivas, caracterizado pela formação de uma linha descontínua de ZO-1 entre as células (Figura 18).

A partir de 3 h no meio com cálcio, as células controle já tinham praticamente reestabelecido a polaridade (Figura 18), caracterizado por uma linha contínua de ZO-1 entre as células, assim como as células transfectadas com o Myc::Par6 (127-370) (não interage com aPKC), por exemplo (Figura 18). Com 6 h em condições

RESULTADOS

normais de cálcio, as células tanto do controle quanto as transfectadas com as proteínas truncadas já tinham completado o restabelecimento das junções e não apresentaram atraso no reestabelecimento da polaridade celular (Figura 18). Esses dados mostraram que as proteínas truncadas, além de não interferirem com o acúmulo apical de actina durante o alongamento do placóide, não interferiram com a *manutenção e estabelecimento* das junções oclusivas (ZO-1), sugerindo que as proteínas truncadas clonadas podem não ter efeito sobre a polaridade celular.

Figura 18: Células MDCKs transfectadas com a proteína truncada PAR6(127-370). As células controle não transfectadas (A, D, G) e as células transfectadas com Myc::Par6(127-370) (B, E, H) foram fixadas em diferentes tempos 0h, 3h e 6h após a adição de meio com cálcio, e imunomarcadas para a proteína ZO-1 (A,D,G, e C,F,I). As setas indicam as células transfectadas.

RESULTADOS

4.4 Ativação do complexo PAR

A GTPase Cdc42 exerce diversos papéis na célula. Além de atuar na migração, na morfologia e no ciclo celular, tem papel na polarização celular, na ativação do complexo PAR-6/PAR-3/aPKC e na regulação do citoesqueleto de actina (Heasman, Ridley, 2008). Quando Cdc42 está ligado à GTP ela é capaz de fosforilar PAR-6, se ligando ao seu domínio Semi-CRIB e PDZ, ativando o complexo e iniciando o seu papel na polarização celular (Garrard et al., 2003).

Com o objetivo de explorar se a ativação do complexo PAR pela GTPase Cdc42 tem efeito sobre a polarização apico-basal do placóide do cristalino, foi feita interferência com a atividade de Cdc42 através de seu dominante negativo (DNCdc42 T17N), que apresenta uma substituição do resíduo de treonina pela asparagina no resíduo 17. Isso leva à perda e redução de sua afinidade por GTP e GDP, respectivamente. Sendo assim, a proteína Cdc42 fica sempre em seu estado livre ou inativo. Além disso, o dominante negativo liga-se fortemente às GEFs, proteínas ativadoras de GTPases (trocam GDP por GTP), bloqueando a ligação destas ao Cdc42 endógeno impedindo sua ativação. Os embriões foram eletroporados em estágio HH9. Neste estágio, a vesícula óptica ainda não evaginou do tubo neural, e portanto não entrou em contato com o ectoderma pré-placoidal e ainda não o induziu a se alongar para formar o placóide do cristalino.

Os embriões eletroporados com a forma Myc::DNCdc42 foram contracorados com DAPI (núcleo) e faloidina (actina) e foram submetidos à imunofluorescência utilizando-se anticorpos anti-myc para a localização da forma dominante negativa de CDC42, anticorpos anti-ZO-1, proteína presente em junções oclusivas e anticorpos anti- β catenina, proteína presente em junções aderentes. Dentre as células eletroporadas, foi possível identificar células que apresentaram núcleo picnótico (Figura 19, setas nos aumentos de A, B e C), característico de célula em apoptose e redução de actina, ZO-1 e β -catenina (Figura 19, cabeças de seta nos aumentos de A, B e C). Além disso, algumas células possuíam formas arredondadas e alongadas (Figura 19, seta e cabeça de seta nos aumentos em C) diferente de um ectoderma pré-placoidal normal em que as células possuem forma cuboide.

RESULTADOS

RESULTADOS

Figura 19: O DNCdc42 gera diversas alterações celulares no placóide do cristalino. Embriões eletroporados com o DNCdc42 fusionado à Myc (Myc::DNCdc42:). No lado esquerdo esquemas mostram as regiões das imagens em A, B e C. Os aumentos dos quadrados em A, B e C estão à direita em A', B' e C'. Em verde: células eletroporadas com o DNCdc42. Em vermelho: beta-catenina (A e A'), Actina (B e B') ou ZO-1 (C e C'). Em azul: DAPI. Seta Branca: Células eletroporadas com núcleo picnótico (azul). Cabeça de seta: células eletroporadas com redução de β -catenin, actin e ZO-1 (A', B' e C', vermelho). Células eletroporadas com forma arredondada e alongada (seta e cabeça de seta em B' e C'). O ectoderma pré-placoidal (E) está localizado à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica (VO) está localizada à esquerda da linha pontilhada. Os retângulos nos esquemas à esquerda delimitam a área das figuras Barra: 5 μ m, Barra dos aumentos marcados com DAPI (azul): 10 μ m.

Os fenótipos obtidos através da eletroporação com o Myc::DNCdc42 levaram a duas questões: a redução de actina e de proteínas de junções celulares foi resultado da inibição através do DNCdc42 ou a redução foi causada devido à morte celular, ou seja, as células morreram e por isso houve perda de junções celulares?

Como as GTPases desempenham diversos papéis na célula, interferir com o DNCdc42 através da sua superexpressão gerou diversas alterações difíceis de se interpretar, principalmente sobre o domínio apical, que é o nosso objetivo principal. Para tentar elucidar melhor o papel da GTPase Cdc42, foi realizada uma construção na qual o MycDNCdc42 foi fusionado à proteína VSVG na região 5'. O VSVG (vesicular stomatitis vírus G protein) é uma glicoproteína presente no envelope viral que permite a entrada do vírus na célula. Após a infecção da célula com o este tipo de vírus (VSV), a proteína VSVG é produzida e endereçada para a membrana apical da célula onde o vírus será envelopado. Devido a essa característica, a proteína VSVG foi fusionada ao Myc::DNCdc42, com o intuito de endereçar o dominante negativo para a região apical das células do placóide do cristalino e alterar apenas componentes celulares do domínio apical. A fusão do VSVG a uma proteína específica com o intuito de direcioná-la para o domínio apical já foi vista no placóide do cristalino invaginando através da fusão da proteína VSVG à GTPase Rho para

RESULTADOS

avaliar sua função na constrição apical do placóide do cristalino (Tymothy et al., 2011).

Os embriões foram eletroporados com 1µg/µl do plasmídeo contendo as proteínas fusionadas, no estágio pré-placoidal (HH9, 29-33h de incubação), e analisados no estágio de placóide (HH13, 48-52h de incubação). Os embriões foram submetidos à imunofluorescência para as proteínas Myc, Zo-1 e β -catenina e foram contra-corados com faloidina (actina) para avaliar se o DNCdc42 no domínio apical é responsável por alterar a polarização de actina e das proteínas de junções.

A imunofluorescência revelou tanto células com o VSVG::DNCdc42 na região apical (Figura 20, setas) quanto na região baso-lateral e citoplasmática (Figura 20, cabeças de seta) e a proteína VSVG::DNCdc42 não causou uma série de alterações, como morte celular, alterações no formato celular e na localização das proteínas ZO-1, beta-catenina e actina (Figura 20). Além disso, o DNCdc42 realocado para o domínio apical através da proteína VSVG não alterou a polarização das proteínas beta-catenina, actina e ZO1 para a região apical (Figura 20). Como a concentração do plasmídeo não pode ser alta para não ter acúmulo do dominante negativo na região baso-lateral e as células são eletroporadas em mosaico, foi difícil avaliar se o DNCdc42 causou algum efeito na polarização de actina e de junções.

Figura 20: O DnCdc42 endereçado para a região apical não afeta a polarização no placóide do cristalino. Embriões foram eletroporados com o DnCdc42 fusionado a VSVG e Myc (VSVG::Myc::DN-Cdc42, verde). Em vermelho, imunomarcção para β -catenin (A) e ZO-1 (C) e marcação para actina (B). Seta Branca: VSVG::DnCdc42 na região apical. Cabeça de seta: VSVG::DnCdc42 na região baso-lateral e citoplasmática. À direita da linha pontilhada: placóide (P) e à esquerda da linha pontilhada: vesícula óptica (VO). Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-C. Barra: 10 μ m.

RESULTADOS

4.5 Par3 induz a formação de agregados ectópicos de actina

Durante o estabelecimento da polaridade celular, PAR3 tem sido proposto como o primeiro componente do complexo PAR a segregar para a membrana apical e recrutar aPKC e PAR6 (Gao et al., 2002; Feng et al., 2007; Tabuse et al., 1998). Como PAR3 localiza-se em um subdomínio apical abaixo de aPKC e PAR6, investigou-se se PAR3 sozinho é suficiente para recrutar outras proteínas apicais no contexto do placóide do cristalino, a superexpressão da proteína PAR3 de *Gallus gallus* fusionada à GFP (cPAR3::GFP) foi realizada no estágio pré-placóidal e analisada após o alongamento do placóide (2,5 µg/µl).

Aglomerados ectópicos de cPAR3::GFP foram detectados na membrana apical e baso-lateral (Figura 21 A, B). Além disso, foram encontradas tanto a proteína beta-catenina quanto actina ectópica nesses aglomerados basolaterais de PAR3 (Figura 21 A', B'), sugerindo que PAR3 possa estar envolvido no recrutamento de actina e beta-catenina para a membrana apical durante o alongamento do placóide.

A homodimerização da proteína PAR3 é devido a um domínio amino-terminal (NTD/CR1) conservado (Figura 22, Article et al., 2013), e responsável pela localização de PAR3 na membrana celular (Feng et al., 2007). Para verificar se o domínio de homodimerização é necessário para o estabelecimento de aglomerados ectópicos de PAR3 e sua localização na membrana durante o desenvolvimento do cristalino, foi feita a superexpressão da forma truncada de PAR3, o cPAR3-N::GFP que não possui o domínio de homodimerização (Figura 21, Afonso, Henrique, 2006).

A forma truncada foi encontrada esparsamente pelo citoplasma, não formou aglomerados ectópicos e não recrutou actina ectópica para o domínio baso-lateral (Figura 21 C, C'). Esses dados demonstram que o domínio de homodimerização de PAR3 é importante para formar aglomerados ectópicos da proteína na membrana celular e sugere que a ligação de PAR3 à membrana é importante para o recrutamento de actina e beta-catenina. Não foram detectadas alterações na rede de actina apical endógena na superexpressão do PAR3 completo e da forma truncada (Figura 21 B', C').

Figura 21: A superexpressão de PAR3 recruta actina ectópica na região basolateral da membrana. A superexpressão de cPAR3::GFP forma agregados ectópicos na membrana das células do placóide (A e B, setas) e recruta beta-catenina e actina (A' e B', setas). A proteína cPAR3-N::GFP, que não possui o domínio CR1 de oligomerização de PAR3, não forma agregados ectópicos na membrana celular do placóide do cristalino (C-C'). A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O placóide (P) está localizado à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica (VO) está localizada à esquerda da linha pontilhada. Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras Barra de escala:

RESULTADOS

Figura 22: Domínios da proteína PAR3 de *Gallus gallus*. Par3 possui um domínio CR1 de auto-oligomerização, três domínios PDZ, sendo que o primeiro é de interação com PAR6, um domínio de ligação ao aPKC e a treonina 833 no domínio de ligação ao aPKC que é fosforilada por ROCK. A proteína PAR3-N não possui o domínio CR1.

4.6 O recrutamento de actina é independente da fosforilação da treonina 833

Se o acúmulo de actina ectópica dirigida por PAR3 requer o recrutamento de outros componentes do complexo PAR apical, então a redução da afinidade de PAR3 por PAR6 e aPKC deveria reduzir ou inibir esse evento.

Sabe-se que PAR3 possui regiões em seu domínio de ligação ao aPKC que podem ser fosforilados por ROCK levando à dissociação do complexo PAR3/PAR6/aPKC (Nakayama et al., 2008, Nishimura et al., 2005). Um dos potenciais sítios que determinam a afinidade de PAR3 por outros membros do complexo PAR apical é a treonina 833 (Thr833) (Figura 22). A troca da Thr833 no domínio de ligação ao aPKC por uma alanina (PAR3T833A) reduz a fosforilação de PAR3 por ROCK aumentando a estabilidade do complexo (Nakayama et al., 2008). Em contraste, a troca da Thr833 por um aspartato (PAR3T833D), mimetizando uma fosforilação, leva a uma redução na interação de PAR3 com aPKC (Nakayama et al., 2008).

Se o resíduo de treonina de PAR3 é importante para a ligação de PAR3 à aPKC *in vitro*, a superexpressão do mutante do Myc-PAR3T833A deveria recrutar aPKC ectópico e Myc-PAR3T833D deveria inibir esse recrutamento *in vivo*, nas células que originarão o cristalino. Para testar essa hipótese, os embriões foram

RESULTADOS

eletroporados com os mutantes Myc-PAR3T833A ou Myc-PAR3T833D e imunomarcados para Myc e aPKC. Ambos os mutantes formaram aglomerados ectópicos na membrana baso-lateral, recrutaram aPKC ectópico para esses aglomerados (Figura 23) e não afetaram a localização apical de aPKC, sugerindo que a fosforilação do resíduo treonina 833 não interfere na associação com aPKC no contexto da embriogênese do cristalino e que a formação de aglomerados ectópicos é independente do estado de fosforilação desse resíduo de PAR3.

Figura 23: A superexpressão de PAR3T833A ou PAR3T833D recruta aPKC ectopicamente. A superexpressão de PAR3T833A (A) e PAR3T833D (B) forma agregados ectópicos (setas em A' e B', verde) na membrana baso-lateral e recruta aPKC (setas em A' e B', vermelho). A' e B' são aumentos da área delimitada em A e B. O placóide (P) e o ectoderma peri-placoidal (EPP) estão localizados à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica (VO) está localizada à esquerda da linha pontilhada. Os retângulos nos esquemas à esquerda delimitam a área das figuras. Barra de escala em A e B: 10µm, em A' e B': 5µm.

RESULTADOS

Baseados no fato de que o estado de fosforilação da Thr833 de PAR3 não interfere com o recrutamento de aPKC e que PAR3 é capaz de recrutar actina ectópica, resolveu-se investigar se o estado de fosforilação da Thr833 é relevante para o recrutamento de actina apical. O mutante de PAR3, Myc-PAR3T833A, deveria interagir mais fortemente as proteínas do complexo apical e recrutar maior quantidade de actina, e o mutante de PAR3, Myc-PAR3T833D, deveria reduzir a afinidade pelo complexo apical e reduzir o recrutamento de actina. O ectoderma pré-placoidal foi eletroporado com os mutantes Myc-PAR3T833A e Myc-PAR3T833D e analisado do estágio de placóide. Nenhum dos mutantes alterou o acúmulo apical de actina no placóide (Figura 24 B-C", setas) quando comparados com o controle eletroporado com o plasmídeo pMES sem inserto (Figura 24 A-A"). Como o placóide possui um grande acúmulo de actina apical, a eletroporação pode não ter sido suficiente para alterar visivelmente o acúmulo de actina apical ou os mutantes não foram capazes de interferir com o recrutamento de actina para o compartimento apical.

RESULTADOS

Figura 24: Os mutantes de PAR3T833D e PAR3T833A não afetam a polarização de actina endógena no placóide do cristalino. O ectoderma pré- placoidal foi eletroporado com o plasmídeo controle pMES sem inserto mas com a sequência do GFP (A) ou contendo o Myc::PAR3T833D (B) ou Myc::PAR3T833A (C) e foram imunomarcados para Myc ou GFP e marcados para actina no estágio de placóide. Os mutantes de PAR3 não inibiram o acúmulo apical de actina no placóide do cristalino (A', B' e C'). A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. O placóide está localizado à direita da linha pontilhada. Setas: células eletroporadas com actina apical. Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-C". Barra de escala: 5µm.

RESULTADOS

A análise do papel dos mutantes no placóide do cristalino é difícil, pois nesse tecido há um acúmulo muito grande de actina na região apical. Quando o ectoderma peri-placoidal foi eletroporado com os mutantes de PAR3, a análise do papel dos mutantes no recrutamento de actina ficou mais claro, pois nesse tecido não existe acúmulo de actina apical e, além disso, ele possui as mesmas características do ectoderma antes de se alongar para formar o placóide.

No ectoderma peri-placoidal, ambos os mutantes de PAR3 formaram aglomerados ectópicos e recrutaram actina ectópica para o domínio baso-lateral (Figura 25 A-B', setas), mostrando que o recrutamento de actina é independente da fosforilação da treonina 833 de PAR3.

RESULTADOS

Figura 25: A superexpressão de PAR3T833A ou PAR3T833D recruta actina ectopicamente. A superexpressão de PAR3T833A (A) e PAR3T833D (B) forma agregados ectópicos (setas em A' e B', verde) na membrana baso-lateral no estágio de ectoderma pré-placoidal e recruta actina (setas em A' e B', vermelho). A' e B' são aumentos da área delimitada em A e B. O placóide (P) está localizado à direita da linha pontilhada e a vesícula óptica (VO) está localizada à esquerda da linha pontilhada. Os retângulos nos esquemas à esquerda delimitam a área das figuras A e B. Barra de escala em A e B: 10µm, em A' e B': 5µm.

Interessantemente, no ectoderma periplacoidal, onde não há recrutamento apical de actina, ambos os mutantes aumentaram a quantidade de actina no domínio apical (Figura 26). Esse recrutamento apical de actina acompanha a distribuição dos mutantes Myc-PAR3T833A ou Myc-PAR3T833D que também possuem um acúmulo apical (Figura 26 B-C"). Estes resultados contrastam com os que foram obtidos com eletroporações de plasmídeo controle. Neste caso, GFP está expresso no citoplasma e a actina fica distribuída ao longo do eixo apico-basal, sem acúmulo apical ectópico (Figura 26 A-A"). Notou-se, também, que a disposição dos agregados de actina ectópica recrutada pela proteína PAR3 varia de acordo com a sua localização subcelular. Na membrana baso-lateral, os aglomerados ectópicos de actina formam estruturas pontuais, enquanto que na membrana apical do ectoderma peri-placoidal, os filamentos de actina ectópicos possuem uma conformação parecida com uma faixa, um cinturão (Comparar figuras 25 e 26).

RESULTADOS

Figura 26: PAR3T833A aumenta a actina apical na ectoderme peri-placoidal.

Os embriões foram eletroporados com o plasmídeo pMES controle sem inserto, mas com a sequência do GFP (A), Myc::PAR3T833A (B) ou Myc::PAR3T833D (C) no ectoderme peri-placoidal, a ectoderme adjacente ao placóide. A superexpressão de Myc::PAR3T833A e Myc::PAR3T833D aumenta o acúmulo apical de actina na ectoderme peri-placoidal (B'- B'' e C-C'' compare com o controle A'-A''). Os gráficos mostram a quantificação relativa dos valores dos pixels obtidos da marcação para actina (vermelho) e da imunomarcação para Myc ou GFP (verde) das áreas delimitadas. A membrana apical está localizada mais à direita da imagem. EPP: Ectoderme peri-placoidal. P: Placóide. VO: Vesícula óptica. Os retângulos nos esquemas à direita delimitam a área das figuras A-C'. Barra de escala: 5µm.

5 DISCUSSÃO

A polarização apical de actina é um evento importante durante a morfogênese do cristalino, pois permite a formação de uma rede contrátil de actina-miosina na região apical que irá levar à redução da área apical e invaginação do placóide do cristalino. Neste trabalho, a proposta foi investigar o papel de proteínas de polarização no recrutamento de actina para a porção apical das células durante o alongamento do placóide. As proteínas de polarização investigadas foram as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC, proteínas que se encontram na região apical antes mesmo do alongamento do placóide. Os dados obtidos sugerem que, dentre as proteínas do complexo PAR, a proteína PAR3 pode ter papel no recrutamento de actina para a região apical das células do placóide do cristalino.

5.1 Polarização dos elementos celulares durante o alongamento do placóide.

Viu-se através da caracterização dos elementos celulares durante o desenvolvimento inicial do cristalino, que as células do ectoderma pré-placoidal possuem uma polaridade apico-basal definida, caracterizada pela localização apical de ZO-1, proteína presente nas junções oclusivas, de beta-catenina, proteína presente em junções aderentes, e das proteínas do complexo PAR, PAR3, PAR6 e aPKC). Essas características estão presentes em outros modelos de epitélios polarizados como, por exemplo, em cultura de células de epitélios de mamíferos, no epitélio e nas células foliculares de *Drosophila* (Suzuki, Ohno, 2006) e em neuroepitélio de embrião de galinha (Afonso, Henrique, 2006).

A imunofluorescência para as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC revelaram que apesar dessas proteínas estarem no domínio apical durante o desenvolvimento do placóide do cristalino, elas se localizam em subdomínios diferentes. PAR6 e aPKC estão presentes em um subdomínio apical a PAR3 e este último localiza-se no nível das junções oclusivas. Essa localização subcelular, ocorre também em células foliculares de *Drosophila*. Neste modelo, PAR6 e aPKC se localizam apicalmente a PAR3, enquanto que PAR3 se localiza levemente abaixo de PAR6/aPKC, no nível das junções aderentes (Moraes-de-Sá et al., 2010). O mesmo ocorre em epitélios de mamíferos, no qual PAR6/aPKC se encontram em um subdomínio apical a PAR3, mas nesse caso PAR3 localiza-se no nível das junções oclusivas (Chen, Zhang, 2013), vale ressaltar que as junções oclusivas não estão presentes em *Drosophila*,

DISCUSSÃO

nesse animal existe um domínio (SCAR) com proteínas que são correspondentes às proteínas de junções oclusivas em epitélios de vertebrados (Knust, Bossinger, 2002). Em contrapartida, em cultura de células MDCKs, essa característica não é a mesma, uma vez que, as proteínas PAR3, PAR6 e aPKC co-localizam com ZO-1 na região apical, sugerindo que nesse contexto a formação do complexo PAR3/PAR6/aPKC seja importante para o estabelecimento da polaridade celular (Yamanaka et al., 2001).

A polarização de epitélios não depende apenas das proteínas do complexo PAR apical, outras proteínas de polarização também estão presentes em epitélios polarizados, como por exemplo as proteínas LGL (Lethal Giant Larvae) e PAR1 que se localizam no domínio baso-lateral da célula (Suzuki, Ohno, 2006, Chen, Zhang, 2013). No ectoderma pré-placoidal e no placóide do cristalino, a proteína PAR1 foi encontrada no núcleo, ao contrário do que se sabe sobre o padrão de expressão da proteína PAR1 que, em epitélios, se localiza no domínio baso-lateral. Essa localização de PAR1 no núcleo das células do placóide sugerem que o anticorpo pode não ser específico para PAR1 de galinha e esteja marcando um outro tipo de proteína nuclear.

Apesar de alguns elementos celulares (Ex.: Proteínas PAR e ZO-1) estarem polarizados antes mesmo do alongamento do placóide, ainda há um comportamento dinâmico de outros elementos ao longo do eixo apico-basal durante a morfogênese do cristalino. No processo de alongamento celular para formar o placóide do cristalino, os filamentos de actina, a miosina e a beta-catenina que antes se localizavam ao longo do eixo apico-basal, com o alongamento das células do placóide, segregam assimetricamente para a região apical (Borges et al., 2011). O núcleo se move para o domínio basal e os filamentos de microtúbulos se polimerizam paralelos ao eixo apico-basal (Bancroft, Bellairs, 1977; Byers, Porter, 1964; Zwaan et al., 1969). Além disso, filopódios emergem da superfície basal do placóide em direção à vesícula óptica ancorando esses dois tecidos (Chauhan et al., 2009). O acúmulo apical da rede contrátil de actina-miosina e sua atividade no domínio apical do placóide do cristalino são necessários para o evento posterior ao alongamento, a invaginação das células do cristalino.

A localização apical de actina é um consenso no paradigma do placóide após o alongamento, mas o que não se sabe exatamente é qual é a arquitetura do citoesqueleto de actina formado na região apical do placóide do cristalino. Sabe-se

DISCUSSÃO

que a organização dos filamentos de actina depende da sua função nos diversos processos celulares, como, por exemplo, no processo de migração celular, divisão celular e morfogênese. Os filamentos de actina podem ser modelados através de agentes nucleadores e inibidores de polimerização. Existem dois tipos de nucleadores de actina mais comumente estudados: o complexo ARP2/3 e forminas (Lecuit et al., 2011).

O complexo ARP2/3, bastante estudado em células em migração, se associa a um filamento de actina pré-existente e tem função na formação de filamentos ramificados de actina (Lecuit et al., 2011; Welch, 1999). O complexo ARP2/3 sozinho é um nucleador de baixa eficiência e requer a ligação a um promotor de nucleação como o WASP. A proteína WASP se liga ao complexo ARP2/3 e o direciona aos filamentos de actina, a atividade de WASP pode ser aumentada através da ligação e ativação pelas GTPases Rac1 e Cdc42 (Campellone, Welch, 2010)

No placóide do cristalino, o acúmulo apical de filamentos de actina é seguido pelo acúmulo de ARP3, que antes do alongamento, no estágio de ectoderma pré-placoidal, se encontra ao longo do eixo apico-basal, sugerindo um envolvimento de ARP na formação da rede de actina apical

Uma função do complexo ARP2/3 no placóide do cristalino poderia estar relacionada ao alongamento celular. Em camundongos, foi visto que o mutante condicional de Rac reduz o alongamento apico-basal celular e reduz os níveis de Arpc2, uma subunidade do complexo ARP2/3. No entanto, o mutante de RhoA, que regula a constrição apical, leva a uma redução na constrição apical e um aumento dos níveis de Arpc2, sugerindo que há um balanço entre a atividade de RhoA e Rac-ARP2/3 para permitir o alongamento e em seguida a invaginação do placóide do cristalino (Chauhan et al., 2011).

Uma outra função do complexo ARP2/3 durante a morfogênese do placóide do cristalino pode estar envolvida com a organização da actina apical para a constrição. Apesar da maioria dos estudos mostrarem que o complexo ARP2/3 está envolvido na formação de actina na região do lamelipódio no processo de protrusão de células migratórias (Lecuit et al., 2011) e não com a formação de fibras de estresse, foi visto que na ausência de ARP2/3 há uma desorganização da rede de actina que fica na região apical das células que irão internalizar durante a gastrulação de nematódeo e, que mesmo com a presença e ativação da miosina, a constrição apical não ocorre nessas células (Rho-Johnson, Goldstein, 2009),

DISCUSSÃO

sugerindo que o complexo ARP2/3 esteja regulando a organização da actina e que essa organização é importante para que a miosina possa contrair a rede de actina apical.

Por fim, o complexo ARP2/3 pode estar envolvido com a dinâmica das junções aderentes no processo de alongamento e invaginação do placóide do cristalino. As junções aderentes são estruturas dinâmicas e sua formação, desarranjo e reciclagem são importantes para manter a estabilidade do tecido durante o remodelamento celular (Baum, Georgiou, 2011; Le et al., 1999). O complexo ARP2/3, junto com Cdc42/aPKC/PAR6, são responsáveis pelo processo de endocitose de E-caderina que é internalizada e reciclada ativamente (Baum, Georgiou, 2011). A inibição de ARP2/3 causa desorganização de actina e desfaz a continuidade do cinturão de junções (Georgiou et al., 2008; Rho-Johnson, Goldstein, 2009). Esses dados sugerem que ARP3 pode estar regulando a estabilidade das junções celulares e, da mesma maneira, a estabilidade dos filamentos de actina associados às junções permitindo que a integridade da célula seja mantida durante processos de morfogênese.

5.2 O Complexo PAR na polarização do placóide do cristalino

Baseados na caracterização das proteínas PAR, verificou-se que a polarização dessas proteínas ocorre antes do alongamento celular. Como durante o alongamento celular alguns elementos, principalmente a actina, se polarizam para a região apical, hipotetizou-se que a polarização dos elementos celulares, durante o desenvolvimento do cristalino, poderia ser guiada pelas proteínas PAR presentes na região apical.

Desta maneira, propôs-se interferir com a interação das proteínas do complexo PAR com o intuito de quebrar a estabilidade do complexo e, consequentemente, afetar a polarização apical de elementos celulares durante o alongamento do placóide. Para responder a essa hipótese, foram construídas proteínas truncadas de PAR6 [PAR6 (1-126) e PAR6 (127-370)] e aPKC (aPKC Δ N47) para impedir a formação do complexo e analisou-se a polarização do citoesqueleto de actina para a região apical. A superexpressão das formas truncadas de PAR6 e aPKC, no placóide do cristalino não afetaram o alongamento do placóide e o recrutamento apical de actina. Esses dados levaram a duas questões: O

DISCUSSÃO

complexo PAR apical é tão estável que a superexpressão dos mutantes não consegue desfazer a união das proteínas do complexo? Ou como no placóide do cristalino as proteínas do complexo estão localizadas em subdomínios diferentes, pode ser que a interação entre elas já esteja desfeita e a utilização de proteínas truncadas não seja suficiente para causar algum efeito na polarização do citoesqueleto de actina.

Em células MDCKs, os ensaios com proteínas truncadas são comumente utilizados, nessas células o complexo PAR3/PAR6/aPKC está localizado no mesmo domínio apical e ensaios com proteínas truncadas na maioria das vezes afeta a polaridade celular (Yamanaka et al., 2001).

Trabalhos da literatura mostraram que a proteína truncada de camundongo PAR6 (1-126) não interfere com a manutenção das junções oclusivas (ZO-1) em células MDCK (Gao et al., 2002). Em contrapartida, PAR6 (102-371), que não possui a região N-terminal, interfere com ZO1 e PAR3 em MDCKs (Joberty et al., 2000), atrasa o estabelecimento das junções oclusivas e perturba a organização de actina (Gao et al., 2002; Gao, Macara, 2004). Além disso, a proteína aPKC sem a região N-terminal (aPKC Δ N47), além de não se associar ao PAR6 também reduz a associação de PAR3 com PAR6 (Suzuki et al., 2001). Para verificar se a formação do complexo celular é irrelevante para a polarização de actina apical no placóide do cristalino, as células MDCKs foram transfectadas com o intuito de investigar se as proteínas truncadas aqui utilizadas alterariam a polaridade de células MDCKs em cultura, através da análise das junções oclusivas. Nenhum dos mutantes transfectados afetou o estabelecimento e a manutenção das junções oclusivas na cultura de células. Portanto, esses dados indicam que as proteínas truncadas construídas não alteram a polaridade celular e sugerem que a formação do complexo PAR possa ser irrelevante para a polarização do placóide do cristalino.

5.3 Cdc42 na polarização do placóide do cristalino

Em vários modelos experimentais foi visto que a GTPase Cdc42 tem função conservada na polarização em epitélios, na regulação do citoesqueleto de actina, na polarização durante o evento de migração, no destino celular durante a divisão e além disso, Cdc42 pode se ligar à PAR6 e ativar o complexo PAR-6/PAR-3/aPKC (Garrard et al., 2003; Heasman, Ridley, 2008; Macara, 2004).

DISCUSSÃO

Em camundongos, a GTPase Cdc42 tem função na formação de filopódios na membrana basal do placóide que se associa fisicamente, através desses filopódios, à vesícula óptica, levando à invaginação do cristalino (Chauhan et al., 2009). A deleção condicional de Cdc42 em progenitores neurais afeta a localização apical das proteínas do complexo PAR e junções aderentes (Capello et al., 2006). Com o objetivo de inibir a função da GTPase Cdc42 no placóide do cristalino de embrião de galinha e de analisar seu papel na polarização desse tecido, nós utilizamos um dominante negativo de Cdc42. A superexpressão do dominante negativo de Cdc42 (DNCdc42) no placóide do cristalino causou uma série de alterações no formato celular, nas junções aderentes e oclusivas, no citoesqueleto de actina e causou morte celular mostrando que Cdc42 está envolvido em vários processos celulares durante o alongamento do placóide. Similarmente, nas células epiteliais de *Drosophila*, o mutante de Cdc42 causa fragmentação e irregularidade nas junções aderentes levando à delaminação de algumas células, apoptose e rompimento da organização da actina apical (Georgiou et al., 2008). A depleção de Cdc42 no disco imaginal da asa e do olho de *Drosophila* leva à apoptose que é reduzida com a indução pelo Cdc42 selvagem (Warner et al., 2010). Como a superexpressão do DNCdc42 causou diversos fenótipos nas células do placóide do cristalino, utilizou-se o DNCdc42 fusionado à VSVG para direcionar o DNCdc42 para a região apical e reduzir os efeitos gerais que o DNCdc42 causou nas células, facilitando, assim, a análise dos efeitos do dominante negativo apenas sobre o nível apical do placóide do cristalino. Essa técnica foi utilizada em células MDCKs, na qual o VSVG foi fusionado à RhoA e endereçado para a membrana apical (Plageman et al., 2011).

A utilização da fusão do VSVG ao DNCdc42 de fato enriqueceu a proteína para a região apical do placóide do cristalino, mas não alterou nem a actina e nem as junções apicais das células do placóide. Como a eletroporação é em mosaico, ou seja, nem todas as células são eletroporadas, não foi possível ver um efeito no placóide como um todo, mesmo assim, as células que foram eletroporadas não alteraram a distribuição apical das proteínas analisadas, o que leva a sugerir que o DNCdc42 na região apical não foi suficiente para desestabilizar a membrana apical. Como o placóide já é um epitélio com a polaridade apico-basal estabelecida, pela presença das proteínas PAR em subdomínios diferentes da membrana apical, talvez o DNCdc42 tenha um papel no estabelecimento da polaridade apical e não na manutenção.

5.4 PAR3 na polarização de actina apical no placóide do cristalino

Como nenhuma das alternativas para desestabilizar a interação das proteínas do complexo PAR3/PAR6/aPKC tiveram efeito sobre a polaridade do placóide do cristalino e como PAR3 se localiza em um subdomínio abaixo de aPKC e PAR6, esses dados sugerem que PAR3 possa estar agindo separadamente de PAR6/aPKC. Desta maneira, pode ser que a interação das proteínas do complexo PAR6/aPKC com PAR3 não seja importante para o recrutamento de actina durante o alongamento do placóide.

O modelo que emergiu desses estudos foi que durante o estabelecimento da identidade apical em um epitélio em desenvolvimento, PAR3 chega primeiro a uma região particular da membrana, recruta PAR6/aPKC e ancora o complexo às junções. A aproximação de aPKC ativado ao PAR3 durante esse processo, resulta na fosforilação do domínio de ligação do PAR3 ao aPKC, reduzindo sua afinidade por aPKC, desencadeando o desacoplamento do complexo PAR (Moraes-de-Sa et al., 2010; Nagai-Tamai et al., 2002). Como consequência, PAR6/aPKC se mantém no domínio apical enquanto que PAR3 se localiza ligeiramente mais basal no epitélio polarizado. Essa dissociação libera o aPKC ativo do PAR3 e permite que ambos os elementos realizem suas funções individuais (Georgiou et al., 2008; Moraes-de-Sa et al., 2010).

Um exemplo das funções distintas de PAR3 e aPKC é a participação dessas proteínas em diferentes fases do estabelecimento do complexo juncional nascente. Em vertebrados, inicialmente, o complexo contém caderinas e ZO-1 (Yonemura et al., 1995). Posteriormente, PAR3 e aPKC são recrutados, nessa ordem, para formar agregados pontuais (Suzuki et al., 2002). A superexpressão de PAR3 sozinho foi suficiente para induzir agregados pontuais de junções adesivas na região basolateral da membrana do placóide e das células do ectoderma peri-placoidal o que é consistente com o papel de PAR3 no estabelecimento dos sinais de polarização.

A formação desses agregados ectópicos de PAR3 na membrana lateral é possível devido a um domínio conservado de PAR3 localizado na região N-terminal

DISCUSSÃO

chamado de CR1, responsável por sua auto-oligomerização(NTD/CR1) e ligação à membrana (Chen, Zhang, 2013). Foi visto que a habilidade de PAR3 se agregar na membrana e recrutar proteínas de junções e de polarização depende da presença desse domínio CR1 (Afonso, Henrique, 2006; Benton, Johnston, 2003; Feng et al., 2007; Mizuno et al., 2003) A presença desse domínio CR1 é também crítico para a localização de PAR3 na membrana apical e, conseqüentemente, recrutamento de actina ectópica para esses aglomerados no placóide do cristalino.

Enquanto que o domínio CR1 da proteína PAR3 é responsável pela ligação à membrana ou ao complexo PAR, ele não medeia a interação direta entre PAR3 e PAR6/aPKC (Krahn et al., 2010). Além do domínio CR1, a proteína PAR3 possui três domínios PDZ, um domínio de ligação ao aPKC e um trecho de resíduos carregados positivamente (Chen, Zhang, 2013). Apesar dos extensos estudos sobre os domínios presentes em PAR3, até o momento, poucos resíduos têm sido identificados como diretamente relevantes para a estabilização da polaridade apical do complexo (Khazaei, Püschel, 2009; Nagai-Tamai et al., 2002; Nakayama et al., 2008). Dentre esses, o resíduo treonina 833 no PAR3 de rato foi reportado como sendo um resíduo fundamental na regulação da interação de PAR3 com PAR6/aPKC (Nakayama et al., 2008).

A fosforilação do resíduo T833 de PAR3 por Rho-ROCK ou sua substituição por um resíduo de aspartato, reduz a interação de PAR3 com aPKC e PAR6 em extratos celulares (Nakayama et al., 2008). Este trabalho mostrou que essa substituição não afeta a associação de PAR3 com aPKC no placóide e ectoderma peri-placoidal. Para conciliar esses resultados, foi proposto que a importância do estado de fosforilação da T833 do PAR3 depende do evento celular em que PAR3 está envolvido. Nas células migratórias, em que a importância da T833 foi inicialmente relatada, os sinais de polarização remodelam a rede de citoesqueleto pré-existente. Aqui, no placóide do cristalino, o estabelecimento dos agregados ectópicos na membrana baso-lateral poderia ser visto como um *novo* evento, em que PAR3 inicia a formação de novas junções adesivas (Suzuki et al., 2002). Nesse cenário, o recrutamento de aPKC por PAR3 pode não ser dependente do estado de fosforilação da T833 e em vez disso pode ocorrer através da interação com sítios alternativos. Por exemplo, a Ser827/829 presente no domínio de ligação ao aPKC no PAR3 quando fosforilada reduz a afinidade de PAR3 por aPKC (Nagai-Tamai et al., 2002). Similarmente, aPKC e PAR6 podem também interagir com PAR3 pelo seu

DISCUSSÃO

domínio 2N (domínio que compreende os três domínios PDZ de PAR3) na região carboxi-terminal de PAR3 independentemente da atividade de ROCK (Nakayama et al., 2008).

Apesar de não ter detectado um efeito significativo da fosforilação da T833 na formação de agregados ectópicos de actina, não significa que a via do Rho-ROCK não tenha função importante no processo normal de estabelecimento/manutenção do cinturão de actina apical endógena no placóide do cristalino.

A inibição de Rho-ROCK feita através do fármaco Y27632 desfaz a rede de actina e, por fim, interfere com a invaginação do placóide (Borges et al., 2011). Outro ponto a ser considerado é que provavelmente a qualidade do aPKC recrutado por PAR3 ectópico depende do compartimento sub-celular em que PAR3 está presente. Essas observações levaram a concluir que a conformação dos agregados ectópicos de actina induzidos por PAR3 varia de acordo com sua localização sub-celular. Na membrana baso-lateral das células do placóide e do ectoderma peri-placoidal, a actina ectópica forma aglomerados pontuais. Em contraste, na membrana apical do ectoderma peri-placoidal, os filamentos de actina exibem uma linha contínua (Figura 27). Essa linha contínua não foi observada na membrana baso-lateral.

É possível que a variação na qualidade dos agregados ectópicos de actina nas membranas baso-lateral e apical deve-se a diferenças na disponibilidade de aPKC ativado e/ou moléculas de actina entre esses dois domínios. A atividade quinásica de aPKC não é requerida para o estabelecimento de junções adesivas pontuais mas é essencial para a transição de junções pontuais em junções em forma de cinturão (Kishikawa et al., 2008; Suzuki et al., 2002). Na ausência de atividade de aPKC os agregados pontuais se mantêm imaturos (Suzuki et al., 2002). De fato, as junções adesivas apicais requerem a presença apical de aPKC ativo para sua maturação (Kishikawa et al., 2008). Neste caso, a proposta sugerida por este trabalho é que o PAR3 apical exógeno tenderia a recrutar aPKC ativo que conduziria a maturação de actina ectópica em feixes filamentosos. O domínio baso-lateral pode não apresentar os efetores a jusante que convertem actina pontual em feixes em forma de cinturão (Figura 27).

Figura 27: Representação do possível o papel do PAR3 no recrutamento de actina. Dependendo do compartimento em que PAR3 se encontra, a arquitetura da actina recrutada ectopicamente pode ser diferente. O PAR3 no domínio apical do ectoderma peri-placoidal recruta actina ectópica em forma de cinturão, já na membrana baso-lateral, PAR3 recruta actina ectópica formando estruturas pontuais na membrana celular. Actina, em roxo. TJ: junções oclusivas. AJ: junções aderentes.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1- O ectoderma pré-placoidal e o placóide do cristalino são epitélios polarizados com um eixo apico-basal definido.
- 2- As proteínas PAR3, PAR6 e aPKC estão presentes no domínio apical antes do alongamento do placóide e estão segregadas em subdomínios apicais diferentes.
- 3- A proteína PAR3 pode ter função na manutenção da polaridade do placóide do cristalino independente das proteínas PAR6/aPKC.
- 4- A função de PAR3 no recrutamento de actina e aPKC, no placóide e ectoderma peri-placoidal, é independente do estado de fosforilação de PAR3 na treonina 833.
- 5- E, por fim, dependendo da localização de PAR3, a organização dos filamentos de actina pode ser distinta. Se PAR3 estiver localizado no domínio apical, a actina possui uma arquitetura em forma de cinturão, já a localização ectópica de PAR3 na membrana baso-lateral forma agregados ectópicos e pontuais de actina.

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS*

Afonso C, Henrique D. PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. *J Cell Sci.* 2006;119:4293–304.

Article R, Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res.* 2013;319:1357–64.

Assémat E, Bazellères E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys. Acta.* 2008;1778: 614–30.

Akimoto K, Mizuno K, Osad S, Hirai S, Tanuma S, Suzukil K, Ohno S. A new member of the third class in the Protein Kinase C family, PKC λ , expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem.* 1994;269:12677-83.

Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ, Prehoda KE. Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6–aPKC. *J Cell Sci.* 2007;120:3200-6.

Baum B, Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol.* 2011;192:907–17.

Bacallao R, Antony C, Dotti C, Karsenti E, Stelzer EH, Simons K. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol.* 1989;109(6 Pt 1):2817-32.

Bancroft M, Bellairs R. Placodes of the Chick Embryo Studied by SEM. *Anat Embryol (Berl).* 1977;151: 97–108.

Benton R, St Johnston D. A Conserved Oligomerization Domain in *Drosophila* Bazooka/PAR-3 Is Important for Apical Localization and Epithelial Polarity. *Curr Biol* 2003;13:1330–4.

Benton R, St Johnston D. *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells. *Cell.* 2003;115:691–704.

Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhöfer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM. Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4013–28.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

REFERENCIAS

- Bohm H, Brinkmann V, Drab M, Henske A, Kurzchalia TV. Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr Biol*. 1997;7:603-6.
- Borges RM, Lamers ML, Forti FL, Santos MF, Yan CYI. Rho signaling pathway and apical constriction in the early lens placode. *Genesis*. 2011;49:368–79.
- Bré MH, Pepperkok R, Hill AM, Levilliers N, Ansorge W, Stelzer EH, Karsenti E. Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *J Cell Biol*. 1990;111(6 Pt 2):3013-21.
- Byers B, Porter KR. Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after inductions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964;52:1091–9.
- Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:237–51.
- Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Bräuninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB, Brakebusch C, Götz M. The Rho-GTPase *cdc42* regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*. 2006;9:1099-107.
- Chalmers AD, Pambos M, Mason J, Lang S, Wylie C, Papalopulu N. *aPKC*, *Crumbs3* and *Lgl2* control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development*. 2004;132:977-86.
- Chapman S, Collignon J, Schoenwolf G, Lumsden A, Communication B. Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier. *Dev Dyn*. 2001;220:284–89.
- Chauhan BK, Disanza A, Choi S-Y, Faber SC, Lou M, Beggs HE, Scita G, Zheng Y, Lang R. *Cdc42*- and *IRSp53*-dependent contractile filopodia tether presumptive lens and retina to coordinate epithelial invagination. *Development*. 2009;136: 3657–67
- Chauhan BK, Lou M, Zheng Y, Lang RA. Balanced *Rac1* and *RhoA* activities regulate cell shape and drive invagination morphogenesis in epithelia. *PNAS*. 2011;108: 18289–94.
- Chen X, Macara IG. *Par-3* controls tight junction assembly through the *Rac* exchange factor *Tiam1*. *Nat Cell Biol*. 2005;7:262–69.
- Chen X, Macara IG. *Par-3* mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *J Cell Biol*. 2006;172(5):671–78.
- Chen J, Zhang M. The *Par3/Par6/aPKC* complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res*. 2013;319:1357–64.
- Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, Müsch A. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol*. 2004;16:1-11.

REFERENCIAS

- Costa-Junior HM, Suetsugu MJ, Krieger JE, Schechtman D. Specific modulation of protein kinase activity via small peptides. *Regul Pept.* 2009;153(1-3):11-8.
- Cox DN, Lu B, Sun T-Q, Williams LT, Jan YN. *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr Biol.* 2001;11:75–87.
- Cowan CR, Hyman AA. Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development.* 2007;134:1035-43.
- Cvekl A, Tamm E. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays.* 2004; 26:374–86.
- David DJ, Tishkina A, Harris TJ. The PAR complex regulates pulsed actomyosin contractions during amnioserosa apical constriction in *Drosophila*. *Development.* 2010;(137)1645-55.
- Doerflinger H, Benton R, Shulman JM, St Johnston D. The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development.* 2003;130(17):3965-75.
- Doerflinger H, Benton R, Torres IL, Zwart MF, St Johnston D. *Drosophila* Anterior-Posterior Polarity Requires Actin-Dependent PAR-1 Recruitment to the Oocyte Posterior. *Curr Biol.* 2006;16:1090–95.
- Doerflinger H, Vogt N, Torres IL, Mirouse V, Koch I, Nüsslein-Volhard C, St Johnston D. Bazooka is required for polarisation of the *Drosophila* anterior-posterior axis. *Development.* 2010;137:1765-73.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* 2001;20(14):3738-48.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKC ζ . *Cell.* 2004;106:489–98.
- Feng W, Wu H, Chan L-N, Zhang M. The Par-3 NTD adopts a PB1-like structure required for Par-3 oligomerization and membrane localization. *EMBO J.* 2007;26: 2786–96.
- Gao L, Joberty G, Macara IG. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol.* 2002;12:221–5.
- Gao L, Macara IG. Isoforms of the Polarity Protein Par6 Have Distinct Functions. *The J Biol Chem.* 2004;279: 41557–62.
- Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO J.* 2003;22(5):1125-33.

REFERENCIAS

- Georgiou M, Marinari E, Burden J, Baum B. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol*. 2008;18:1631–38.
- Gibson MC, Perrimon N. Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;6:747-52.
- Goldstein B, Hird SN. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. 1996;122:1467-74.
- Goldstein B, Macara IG. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell*. 2007;13(5):609-22.
- Gumbiner B, Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol*. 1986;102(2):457-68.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88: 49-92.
- Harris TJC, Peifer M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2005;170:813–23.
- Heasman SJ1, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(9):690-701.
- Hendrix RW, Zwaan J. The matrix of the optic vesicle-presumptive lens interface during induction of the lens in the chicken embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1975;33:1023–49.
- Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M, Knoblich J. Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell*. 2004;6:845–54.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T. An Atypical PKC Directly Associates and Colocalizes at the Epithelial Tight Junction with ASIP, a Mammalian Homologue. *J Cell Biol*. 1998;143:95–106.
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2000;2:531-9.
- Johnson D. I. Cdc42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63, 54–105.
- Johnson DJ, Pringle J.R. Molecular cloning of CDC42 a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*. 1990;111:143–52.
- Khazaei MR, Püschel AW. Phosphorylation of the par polarity complex protein Par3 at serine is mediated by aurora a and regulates its function in neuronal polarity. *J Biol Chem*. 2009;284:33571–79.

REFERENCIAS

Kim SH, Li Z, Sacks DB. E-cadherin-mediated Cell-Cell Attachment Activates Cdc42. *J Biol Chem*. 2000;275(47) 36999–37005.

Kishikawa M, Suzuki A, Ohno S. aPKC enables development of zonula adherens by antagonizing centripetal contraction of the circumferential actomyosin cables. *J Cell Sci*. 2008;121:2481–92.

Kölsch V1, Seher T, Fernandez-Ballester GJ, Serrano L, Leptin M. Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science*. 2007;315(5810):384-6.

Knust E, Bossinger O. Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science*. 2002;298:1955-9.

Lang RA. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol*. 2004;48: 783–91.

Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-Cadherin: A Potential Mechanism for Regulating Cadherin Dynamics. *J Cell Biol*. 1999; 146: 219–32.

Lecuit T, Lenne P-F, Munro E. Force Generation, Transmission, and Integration during Cell and Tissue Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:157–84.

Lecuit T, Lenne P-F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:633-44.

Leibfried A, Fricke R, Morgan MJ, Bogdan S, Bellaiche Y. *Drosophila* Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Curr Biol*. 2008;18:1639-48.

Lin D, Edwards S, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott, JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol*. 2000;2:540–7.

Lovicu FJ, McAvoy JW. Growth factor regulation of lens development. *Dev Biol*. 2005;280:1–14.

Macara IG. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol. Cell Biol*. 2004;5:220–31.

Manabe N, Hirai S-I, Imai F, Nakanishi H, Takai Y, Ohno S. Association of ASIP/mPAR-3 with Adherens Junctions of Mouse Neuroepithelial Cells. *Dev Dyn*. 2002;225:61–69.

Mizuno K, Suzuki A, Hirose T, Kitamura K, Kutsuzawa K. Self association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem*. 2003;278:31240–50.

Morais-de-Sá E, Mirouse V, St Johnston D. aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell*. 2010;141:509–23.

REFERENCIAS

- Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells*. 2002;7:1161–71.
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Kinase Phosphorylates PAR-3 and Disrupts PAR Complex Formation. *Dev Cell*. 2007;14:205–15.
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev Cell*. 2008;14:205–15.
- Nance J, Munro EM, Priess JR. *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. *Development*. 2003;130:5339-50.
- Nelson WJ, Hammerton RW. A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺,K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J Cell Biol*. 1989;108(3):893-902.
- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*. 2005;7:270–77.
- Ogino H, Ochi H, Reza HM, Yasuda K. Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm. *Dev Biol*. 2012;363:333–47.
- Ogino H1, Yasuda K. Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Dev Growth Differ*. 2000;42(5):437-48.
- Ojakian GK1, Schwimmer R, Herz RE. Polarized insertion of an intracellular glycoprotein pool into the apical membrane of MDCK cells. *Am J Physiol*. 1990;258(3 Pt 1):C390-8.
- Ojakian GK1, Nelson WJ, Beck KA. Mechanisms for de novo biogenesis of an apical membrane compartment in groups of simple epithelial cells surrounded by extracellular matrix. *J Cell Sci*. 1997;110(Pt 22):2781-94.
- Plageman TF, Chauhan BK, Yang C, Jaudon F, Shang X, Zheng Y, Lou M, Debant A, Hildebrand JD, Lang R. A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development*. 2011;5188:5177–88.
- Piatigorsky J, Webster HF, Wollberg M. Cell elongation in the cultured embryonic chick lens epithelium with and without protein synthesis involvement of Microtubules. *J Cell Biol*. 1972;55:82-92.
- Roh-Johnson M, Goldstein B. In vivo roles for Arp2/3 in cortical actin organization during *C. elegans* gastrulation. *J Cell Sci*. 2009;122:3983–93.

REFERENCIAS

Rodriguez-Boulan E1, Nelson WJ. Science. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. 1989;245(4919):718-25.

Rose LS, Kemphues KJ. Early patterning of the *C. elegans* embryo Annu. Rev. Genet. 1998;32:521–45.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. Science. 2003;302: 1704-09.

Schook P. Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. A light microscopic and spatial reconstructive study. Acta Morphol Neerl Scand. 1980;18:1–30.

Schoenwolf GC, Powers ML. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. Anat Rec. 1987;218(2):182-95.

St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. Cell. 2010;141: 757–74.

Sullivan CH, Braunstein L, Hazard-Leonards RM, Holen AL, Samaha F, Stephens L, Grainger RM. A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. Int J Dev Biol. 2004;48:771–82.

Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. Atypical Protein Kinase C Is Involved in the Evolutionarily Conserved PAR Protein Complex and Plays a Critical Role in Establishing Epithelia-specific Junctional Structures. J Cell Biol. 2001;152(6):1183–96.

Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. J Cell Sci. 2002;115:3565–73.

Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, Kishikawa M, Hirose H, Amano Y, Izumi N, Miwa Y, Ohno S. aPKC Acts Upstream of PAR-1b in Both the Establishment and Maintenance of Mammalian Epithelial Polarity. Curr Biol. 2004;14:1425-35.

Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. J Cell Sci. 2006;119:979–87.

Swartz ME, Eberhart J, Pasquale EB, Krull CE. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. Development. 2001;128:4669-80.

Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kemphues KJ, Miwa J, Ohno S. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. Development. 1998;125:3607–14.

REFERENCIAS

Tepass U. The Apical Polarity Protein Network in *Drosophila* Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:655–85.

Warner SJ, Yashiro H, Longmore GD. The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Curr Biol.* 2010;8: 677–86.

Wei X, Cheng Y, Luo Y, Shi X, Nelson S, Hyde DR. The zebrafish *Pard3* ortholog is required for separation of the eye fields and retinal lamination. *Dev Biol.* 2004;269:286–301.

Welch MD. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* 1999;9:423-27.

Wrenn JT, Wessells NK. An ultrastructural study of lens invagination in the mouse. *J Exp Zool.* 1969;171:359–67.

Wride MA. Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation.* 1996;61(2):77-93.

Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, Nagai Y, Yamashita A, Hirose T, Ishikawa H, Ohno S. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells.* 2001;6:721–31.

Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 1995;108(Pt 1):127–42.

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

Zhang H, Macara IG. The PAR-6 polarity protein controls dendritic spine density through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Dev Cell.* 2008;14(2):216–26.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequência dos primers

Myc::cPAR-6 (1-126)

Foward: XBAI – KOZAK – Myc – PAR6

5'-TCT AGA GCC GCC ATG GAG CAG AAA CTC ATC TCT GAA GAG GAT CTG
AAC CGG CCT CAC CGC GGG – 3'

Reverse: BAMHI – STOP - PAR6

5'- GGA TCC TCA CTT GTG ATT ATC TGG ACG CAA – 3'

Myc::cPAR-6 (127-370)

Foward: XBAI – KOZAK – PAR6

5'- TCT AGA GCC GCC ATG AAG AAA CCA CAC ATT GTC ATT

Reverse: BAMHI – STOP - Myc - Par6B

5'- GGA TCC TCA CAG ATC CTC TTC AGA GAT GAG TTT CTG CTC CAT TAG
TGT TAT TAT AGT TCC – 3'

HA::PKC λ Δ N47 (PKC λ lambda): Δ 1-47aa

Forward: XbaI-KOZAK- HA-PKC λ

5'-TCT AGAGGCC GCC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG
TGT TCT TTT GAC AAT GAG - 3'

Reverse: ECORI- STOP- PKC λ

APÊNDICES

5'-GAA TTC TCA GAC ACA CTC TTC TGC AGA-3'

Myc::DNCdc42:

Foward: ECORI – KOZAK – MYC - DNCdc42

5` - GAA TTC GCC GCC ATG GAG CAG AAA CTC ATC TCT GAA GAG GAT CTG

ATG CAG ACA ATT AAG TGT GTT - 3`

Reverse: ECORI – DNCdc42

5` - GAA TTC TTA GAA TAT ACA GCA CTT CCT

VSVG:

Foward: XbaI – KOZAK - VSVG

5` - TCTAGAGCCGCCATGAAGTGCCTTTTGTACTTA – 3`

Reverse:: XbaI - VSVG

5` - TCTAGACTTTCCAAGTCGGTTCATCTC – 3`

APÊNDICES

APÊNDICE B - Alinhamento das seqüências de PAR-1

APÊNDICES

Alinhamento de PAR-1 de *C. elegans* com as Marks de *Gallus gallus* presentes no banco de dados do NCBI. Primeira linha MARK3 isoforma 2, segunda linha MARK3 isoforma 1, terceira linha MARK1 e quarta linha PAR-1 de *C. elegans*.