

Título do Projeto: Estudo do papel do ácido retinóico na padronização dorso-ventral do tubo neural.

Pesquisadora responsável: Hozana Andrade Castillo.

Laboratório Nacional de Biociências – LNBio.

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM.

Introdução

O sistema nervoso central (SNC) é formado a partir da placa neural, uma camada de tecido epitelial que deriva da ectoderme dorsal do embrião. O ácido retinóico (AR) é requerido muitas vezes durante o desenvolvimento do tubo neural para uma série de eventos indutivos. Durante a padronização dorso-ventral do tubo neural, o AR é requerido para a indução de um grupo de interneurônios ventrais conhecidos como V0 e V1, ativando a expressão dos genes *Dbx1*, *Dbx2* e *En1* e reprimindo a expressão de Sonic hedgehog (*Shh*) (Novitch et al., 2003). Num próximo momento, o AR é requerido, em colaboração com *Shh*, para estabelecer o progresso da diferenciação dos motoneurônios a neurônios da Coluna Lateral Motora (CLM), via gene *Olig2* (Novitch et al., 2001). Em estágios posteriores de diferenciação dos motoneurônios, o AR passa a ser sintetizado no tubo neural, através da enzima RALDH2, em um grupo de motoneurônios da Coluna Lateral Motora Medial (CLMM), apenas nos níveis braquial e lombar. Esse AR induz o fenótipo de motoneurônios da Coluna Lateral Motora Lateral (CLML) a neurônios recém-formados na zona ventricular, à medida que eles migram através da LMCM e entram em contato com o AR (Sockanathan and Jessell, 1998). Um segundo território de síntese de AR no tubo neural, também através da enzima RALDH2, é a placa do teto (Berggren et al., 1999). Nesse território, postula-se que o AR atua na padronização dorso-ventral do tubo neural através da especificação de neurônios dorsais, atuando em conjunto com Bone Morphogenetic Proteins (BMPs – fatores de crescimento da família de proteínas TGF – β que atuam de forma parácrina para regular diversas funções durante o desenvolvimento) e Wnts (família de fatores de crescimento de glicoproteínas ricas em cisteínas, que também atuam na regulação de diversos eventos durante o desenvolvimento), moléculas sinalizadoras presentes na placa do teto (Wilson et al., 2004).

Um possível papel da sinalização pelo AR na especificação dos interneurônios envolvidos na propriocepção

A expressão da *raldh2* nos motoneurônios e na placa do teto dentro do tubo neural já é conhecida, porém em (Castillo et al., 2010) foi descrito um território de expressão dessa enzima dentro da medula espinhal de embriões de amniotos nunca descrito anteriormente, os interneurônios dorsais 1 (d11) (Figura 1) (Castillo et al., 2010).

Esses dados sugerem que os papéis da sinalização pelo AR na organização D-V da medula espinal se dão através da difusão do AR produzido na placa do teto para progenitores mais ventrais e também pela sinalização autócrina e transiente nos progenitores dos dI1s. Dessa forma a sinalização pelo AR possivelmente tem um papel importante na especificação dos progenitores dos dI1, que dão origem aos neurônios que formarão os circuitos proprioceptivos espinocerebelares e aos interneurônios comissurais, que cruzam a medula espinal (Bermingham et al., 2001). A relação direta da sinalização pelo AR com o estabelecimento das redes gênicas que levam à diferenciação dessa classe de interneurônios ainda não foi determinada. O objetivo deste trabalho é identificar as alterações no padrão de diferenciação dos dI1 na ausência ou diminuição da sinalização por AR na medula espinal, causada pela eletroporação de morfólino para a raldh2 nesse tecido.

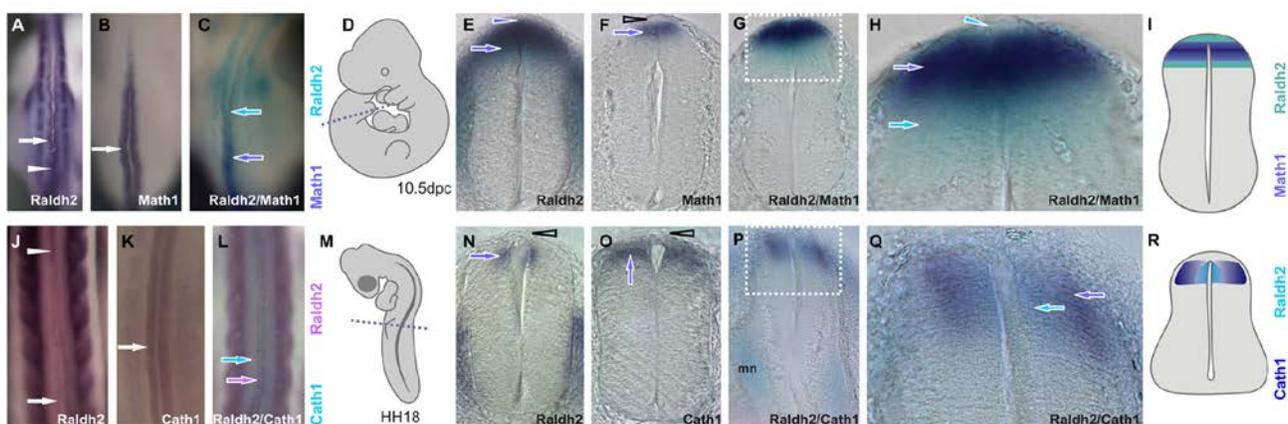


Figura 1. Um novo domínio de expressão de raldh2 em interneurônios dorsais na medula espinal. Expressão bilateral de raldh2 em interneurônios dorsais de embriões de camundongo aos 10.5 dpc (a) e galinha (j). As setas e cabeças de seta em a e j indicam expressão de raldh2 em interneurônios e placa do teto, respectivamente. O domínio de expressão de raldh2 em embriões de galinha muda de um domínio bilateral em interneurônios no nível braquial para um domínio único na placa do teto na linha média no nível cervical. (b, k) A expressão de math-1/cath-1 marca os interneurônios mais dorsais (dI1). (c,l) A hibridação in situ (ISH) dupla para raldh2/math-1 ou cath-1 indica sobreposição dos domínios de expressão de raldh2 e math-1/cath-1 nos dI1. (d,m) Diagrama mostrando a posição do embrião em a-c; j-l e os níveis dos cortes em e-h; n-q. (e) A expressão de raldh2 na medula espinal lombar de embrião de camundongo aos 10.5 dpc vai da placa do teto (cabeça de seta) a interneurônios adjacentes (seta). (f) A expressão de math-1 marca interneurônios dorsais (seta). Note a ausência de marcação na placa do teto (cabeça de seta vazia). (g) ISH dupla para raldh2 (azul claro)/math-1 (azul escuro). (h) Aumento do quadro pontilhado em g. A expressão de raldh2 espalha da placa do teto (cabeça de seta azul claro) até o domínio de math-1 (seta azul escuro), atingindo um domínio ventral aos dI1 (seta azul claro). (i) Esquema da expressão de raldh2 e math-1 na medula espinal lombar de camundongo. (n) Expressão de raldh2 na medula espinal braquial de embrião de galinha em HH18. A raldh2 é expressa na zona ventricular dos interneurônios dorsais (seta), mas não na placa do teto (cabeça de seta vazia). (o) A expressão de cath-1 marca dos dI1 (seta). Note a ausência de coloração na placa do teto (cabeça de seta vazia). (p) ISH dupla para raldh2 (azul claro)/cath-1 (azul escuro). Expressão dorsal de raldh2 a cath-1 e expressão ventral de raldh2 nos motoneurônios. (q) Aumento do quadro pontilhado em p. A raldh2 é expressa na região ventricular (medial) e cath-1 no domínio dos dI1. (r) Esquema da expressão de raldh2 e cath-1.
Fonte: (Castillo et al., 2010).

Objetivo:

Verificar o papel da sinalização pelo ácido retinóico na padronização dorso-ventral da medula espinal, através da identificação dos genes que tem seu padrão de expressão alterado na ausência ou diminuição da sinalização pelo ácido retinóico.

Metodologia:

Racional: Inibir a expressão da Raldh2 (enzima de síntese de ácido retinóico) na medula espinhal em desenvolvimento através da eletroporação de morfolidos, em seguida verificar, utilizando hibridação *in situ* ou imunohistoquímica e PCR em tempo real, se genes envolvidos na diferenciação de interneurônios dorsais tiveram seu padrão de expressão alterado.

Eletroporação: Ovos fertilizados de galinha serão incubados a 38°C até os embriões atingirem o estágio de desenvolvimento desejado (Hamburger and Hamilton, 1951). Morfolinos serão injetadas no lúmen do tubo neural e eletroporadas em um lado do mesmo por eletrodos que flanqueiam, paralelos entre si, o embrião. Serão aplicados seis pulsos elétricos de 15 V com duração de 100 ms cada, usando um eletroporador intracel TSS20 conectado a eletrodos de platina. Os embriões serão incubados novamente e coletados após 24 ou 48 horas. Em seguida serão fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 1 hora.

Hibridação *in situ*: A Hibridação *in situ* em embriões inteiros será realizada de acordo com Wilkinson, usando sondas marcadas com Dig (Wilkinson, 1992). Hibridações *in situ* duplas serão realizadas em embriões inteiros com sondas marcadas com Dig e Fluoresceína como descrito por Stern (Stern, 1998).

Processamento Histológico: Embriões de galinha após terem suas células neurais eletroporadas e após hibridação *in situ* serão incluídos em gelatina 20% (2 banhos de 1 hora cada) e cortados em vibratomo TPI Series 3000, com espessura de 70 µm cada corte.

Ensaio de Imunohistoquímica: Ensaio de imunohistoquímica, serão realizados em cortes transversais de embriões de galinha que tiveram suas células neurais eletroporadas com morfolidos para Raldh2. Primeiramente, os cortes serão lavados com glicina 0,1 M para impedir a autofluorescência. Em seguida, os mesmos serão lavados em PBS 1X (Salina Tamponada com Fosfato) e incubados em Soro de Albumina Bovina (BSA) 1% por 30 minutos, para bloquear a ligação do anticorpo a sítios inespecíficos. O anticorpo primário, diluído em BSA 0,1% (1:100) será aplicado sobre os cortes que permanecerão à 4°C, em câmara úmida durante a noite. No dia seguinte, os cortes serão lavados em PBS 1X e incubados em BSA 1% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, eles serão imersos no anticorpo secundário (diluição 1:700), durante 90 minutos, em câmara úmida e escura. Após esse período, os cortes serão lavados com PBS 1X e analisados em microscópio confocal Leica SP8.

PCR quantitativo em tempo real: O RNA total das medulas espinhais, 24h e 48h após a eletroporação dos morfolidos, será extraído com *Trizol reagent* (Invitrogen) e o mRNA purificado será retrotranscrito com *Superscript III* DNA polimerase (Invitrogen), usando *Oligo(dT)*₁₂₋₁₈ (Invitrogen). O PCR em tempo real será realizado utilizando SybrGreen PCR master mix (Applied Biosystems) e a amplificação será realizada no sistema ViiA™ 7 (Applied Biosystems).