

# 8

# CAPÍTULO

## **MECANISMOS MOLECULARES REGULADORES DA EMBRIOGENÊSE DO TUBO DIGESTIVO**

Alice H. Reis  
Nathalia G. Amado  
Jose G. Abreu

### **8.1 ESPECIFICAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS**

O endoderma origina uma vasta rede de tipos celulares epiteliais altamente especializados que compõem os sistemas respiratório e digestório, e contribui para a formação de órgãos associados, tais como: tireóide, timo, pulmões, fígado, sistema biliar e pâncreas. Perturbações nas funções dos órgãos de origem endodermal são a causa de numerosas doenças humanas. Pesquisas básicas, que visam entender a formação dos órgãos endodermis, tem fornecido o entendimento da base genética de muitas doenças congênitas humanas, e a pesquisa continuada, provavelmente tornará possível o crescimento de tecidos de órgãos endodermis

*in vitro* para futuras terapias baseadas em transplantes (Spence e Wells, 2007; Zorn e Wells, 2009).

O endoderma possui duas grandes funções, a primeira delas consiste em induzir a formação de vários órgãos mesodermiais, instruindo a formação do próprio mesoderma, da notocorda, do coração e de vasos sanguíneos. A segunda função endodermal é a formação de dois tubos no plano corporal de vertebrados. Um deles é o tubo respiratório e o outro é o tubo digestivo, ambos derivados do intestino primitivo. Conforme esses tubos se formam, o mesoderma é recrutado a circundar o endoderma que está invaginando. Dessa forma, a camada mais externa do tubo digestivo será formada por músculo liso, responsável pelos movimentos de peristaltismo, derivado do mesoderma. Na porção mais anterior (boca) e mais posterior (ânus) o epitélio luminal é derivado do ectoderma, porém, a maioria do epitélio do tubo digestivo é derivada do endoderma (Roberts, 2000).

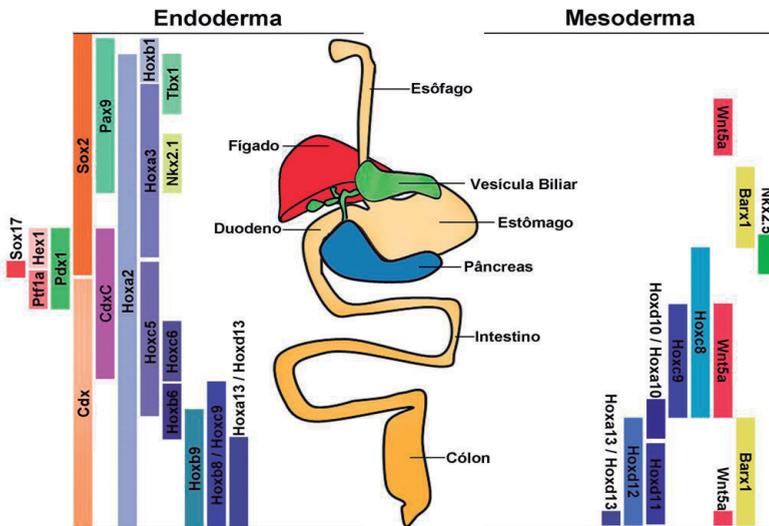
Em humanos o início da formação do tubo digestivo primitivo é estabelecido com dezesseis dias pós fertilização e com dezoito dias já é possível observar a divisão entre os domínios do intestino anterior, médio e posterior. Iniciando, portanto, a diferenciação e especificação dos órgãos e tecidos que farão parte do sistema digestório.

O epitélio endodermal é capaz de responder diferentemente a distintos mensuradores mesodermiais específicos regionalmente, capacitando os tubos digestivo e respiratório a desenvolverem suas estruturas. Portanto, sinais indutivos recíprocos entre endoderma e mesoderma são críticos para o adequado desenvolvimento do tubo digestivo de vertebrados (Roberts et al, 1995). A regionalização do tubo digestivo ao longo dos eixos ântero-posterior, dorso-ventral, direito-esquerdo e radial em distintas zonas e a coordenação das camadas teciduais, de maneira que um determinado tecido endodermal esteja unicamente associado ao seu adequado tecido mesodermal, depende de uma extensiva rede de sinalização entre o endoderma e o mesoderma. Conforme o desenvolvimento prossegue, um amplo padrão de expressão gênica dentro das porções anterior, média e posterior do tubo digestivo se torna progressivamente refinada em precisos domínios que formarão órgãos específicos. A região anterior do tubo digestivo (*foregut*) originará o esôfago, traquéia, estômago, pulmões, tireóide, fígado, sistema biliar e pâncreas. A porção média do tubo digestivo (*midgut*) originará o intestino delgado, e a região posterior (*hindgut*) formará o intestino grosso. Durante a formação dos órgãos, a identidade celular e a morfogênese do tecido devem ser altamente coordenadas. Esses processos são controlados por muitas vias de sinalização e fatores de crescimento que possuem múltiplos papéis durante a organogênese do endoderma.

A via de sinalização de nodal, em todos os vertebrados, é necessária e suficiente para iniciar o desenvolvimento do endoderma e do mesoderma (Zorn e

Wells, 2009). Essa via de sinalização promove a expressão de uma rede conservada em vertebrados de fatores de transcrição dentro da linhagem endodermal que inclui: *Foxa2*, *Sox17*, *Eomesodermina* e *Gata4-6*. Embora o papel preciso desses fatores varie entre espécies, juntos eles ativam uma cascata de expressão gênica que tem como principais funções: 1- Segregar as linhagens endodermis e mesodermis; 2- Estabelecer o comprometimento das células a um destino endodermal; 3- Integrar eventos de sinalização responsáveis por regionalizar o endoderma nascente ( Stainier, 2002; Zorn e Wells, 2007).

Vários fatores de transcrição marcam territórios que darão origem ao esôfago, estômago, fígado, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso muito precocemente no desenvolvimento embrionário. Em camundongos foi observada a expressão assimétrica de certos genes desde 6.5 - 7 dias pós-coito (dpc). A proteína secretada *Cerberus* e os fatores de transcrição homeobox *Orthodenticle homeobox (Otx) 2*, *Homeobox* expresso em células tronco embrionárias 1 (*Hex1*) e *homeobox* hematopoieticamente expresso (*Hex*) são restritos as regiões anteriores do endoderma (Wells e Melton, 1999), enquanto *Sox17* é necessário para a formação do endoderma posterior (Kanai-Azuma et al, 2002). Em conjunto, diferentes genes especificarão molecularmente a padronização do trato gastrointestinal, induzindo ao correto desenvolvimento morfológico e funcional dos diversos órgãos deste sistema (Figura 8.1).



**Figura 8.1** - Limites de expressão dos fatores implicados na especificação do endoderma e do mesoderma que contribuem na formação de órgãos do trato gastrointestinal.

## 8.2 INTERAÇÕES EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

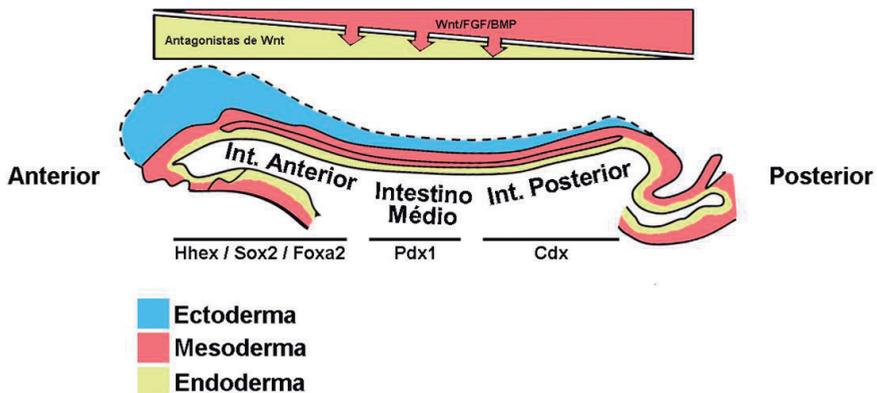
O papel das interações epitélio-mesênquima na regionalização do endoderma tem sido tema de muitas linhas de pesquisa (Grapin-Botton e Melton, 2000). Há décadas, sabe-se que não é possível o adequado desenvolvimento do tubo digestivo sem uma interação entre endoderma e mesoderma (Le Douarin, 1964).

A formação do tubo digestivo, inicialmente, não apresenta diferenças morfológicas entre as suas diferentes regiões. O tubo intestinal primitivo é formado por uma única camada de epitélio colunar circundado por uma fina camada de mesoderma esplâncnico. Conforme o mesoderma cresce e se diferencia em músculo liso, o tubo digestivo altera sua morfologia, resultando em claras demarcações entre as porções anterior, média e posterior do intestino. Essas distinções podem ser feitas pela morfologia, histologia, função e a presença de estruturas de demarcação que separam essas regiões. Muitos estudos tem confirmado que o mesoderma direciona o padrão epitelial no intestino ( Haffen et al, 1983; Kedinger et al, 1986; 1988), porém, o endoderma também possui capacidades indutivas. Alguns dos controles moleculares dos eventos iniciais de indução endoderma-mesoderma estão descritos. *Sonic hedgehog (Shh)* codifica uma molécula de sinalização implicada em mediar a padronização em várias regiões do embrião e está expresso, inicialmente, na região posterior do endoderma intestinal e na região faríngea. O tubo intestinal se estende, aumentando os domínios de expressão de *Shh* por todo o endoderma intestinal. *Shh* é secretado em diferentes concentrações de acordo com a região onde é expresso e seu alvo de sinalização é o mesoderma adjacente ao tubo digestivo. *Shh* induz a expressão da proteína morfogenética do osso 4 (BMP4, do inglês *Bone Morphogenetic Protein*) no mesoderma esplâncnico, que vai controlar o desenvolvimento de músculo liso no intestino. Assim como, sua expressão na região posterior do endoderma intestinal vai induzir a expressão de genes *Hox* no mesoderma, caracterizando essa região como posterior. Já o mesoderma cardíaco é capaz de sinalizar através de *FGFs* (fibroblast growth factors) induzindo o endoderma a expressar marcadores de diferenciação hepática.

Os três domínios do tubo digestivo podem ser identificados pela expressão dos fatores de transcrição *Hhex*, *Sox2* e *Foxa2* na metade mais anterior do embrião, já a porção mais posterior do embrião detecta-se a expressão dos fatores de transcrição da família *Caudal type homeobox*, *Cdx1*, 2 e 4 (Figura 8.2). *Hhex*, *Sox2* e *Foxa2* são requeridos para o desenvolvimento do intestino anterior. Já os genes *Cdx* são necessários para a especificação do território do intestino posterior. Além disso, são necessários para o estabelecimento da borda entre o intestino anterior e posterior que junto com a expressão de *Pdx1* irão estabelecer o domínio do intestino médio (Figura 8.2).

Além desses fatores de transcrição expressos no endoderma, outros genes expressos no mesoderma são fundamentais para a especificação do tecido endodermal. Esses fatores incluem FGF, Wnt e BMP, que são necessários para manter a identidade do intestino posterior e são inibidos na porção mais anterior do embrião, uma vez que esses fatores inibem a formação do intestino anterior. A expressão mesodermal de FGF4 induz a expressão endodermal de Cdx no intestino posterior, além de inibir a expressão de *Hhex* e *Foxa2*. Da mesma forma Wnt é necessário para induzir os territórios posteriores do tubo digestivo, por inibir o destino anterior do intestino primitivo. Nas porções mais anteriores Wnt é inibido por genes expressos no tecido endodermal, como por exemplo SFRP5 (Secreted frizzled related protein 5) que codifica uma proteína secretada que sequestra Wnts. BMPs também promovem o desenvolvimento posterior do endoderma e a presença do Acido Retionóico (AR) é importante para estabelecer a borda entre esses dois territórios endodermis. Em somatório, FGF, Wnt, BMP e AR são fundamentais para regular a expressão de genes *Cdx* e *Hox*, sugerindo que esses fatores sincronizam a identidade ântero-posterior do embrião (Figura 8.2).

Portanto, existe uma ampla rede de comunicação, através de vias de sinalização, entre o endoderma e o mesoderma que comprometerá as células a um destino específico dependendo dos fatores secretados pelos tecidos adjacentes, temporal e espacialmente determinados.



**Figura 8.2** - Modelo de padronização ântero-posterior do tubo digestivo. Durante a gastrulação e somitogênese, níveis diferenciais nas vias de Wnt, FGF4 e BMP ao longo do eixo ântero-posterior padronizam o endoderma em endoderma anterior, médio e posterior através de domínios que expressam os fatores *Hhex*, *Sox2*, *Foxa2*, *Pdx1* e *Cdx*. No endoderma anterior fatores antagonistas de Wnt reprimem a formação do intestino posterior anteriormente, permitindo que estruturas anteriores se formem nesta região.

## 8.3 PADRONIZAÇÃO ÂNTERO-POSTERIOR DO TUBO DIGESTIVO

Ao final da gastrulação o endoderma apresenta amplos domínios ao longo do eixo ântero-posterior de maneira que, essencialmente, a porção anterior do tubo digestivo (*foregut*) esteja localizada dentro do tórax, a porção medial (*mid-gut*) dentro do abdômen e a porção posterior (*hindgut*) dentro da pélvis. Este arranjo sugere que o controle molecular de padronização do plano corporal global pode ser observado também na padronização do intestino ao longo do eixo ântero-posterior. Apesar da diferenciada expressão gênica, o destino endodermal ainda é lábil no início do desenvolvimento embrionário. Os movimentos dinâmicos do tecido durante a gastrulação e os estágios iniciais de somitogênese levam o endoderma a ficar em proximidade com os diferentes tecidos mesodermais que secretam fatores para a padronização. Dentre esses fatores incluem-se os ligantes FGF, Wnt e BMP, que permitem a manutenção da identidade da porção posterior do tubo e ativamente reprimem o destino anterior na região posterior.

Na junção de cada uma das principais regiões do tubo digestivo ao longo do eixo ântero-posterior existe um esfíncter de tamanho e importância variável. Em algumas regiões, os esfíncteres são de importância funcional crítica. A clara restrição de expressão gênica limitada pelos esfíncteres sugere que estas regiões são importantes para a formação de uma padronização do tubo digestivo. Por exemplo, a junção entre as porções anterior e média do tubo digestivo é limitada pelo estômago anteriormente, e pelo duodeno posteriormente. Uma estrutura anatômica característica nesta junção é o esfíncter pilórico. Muitos importantes fatores de padronização do tubo digestivo tem seu limite de expressão ao nível do esfíncter pilórico. Fatores com expressão restrita ao mesoderma anterior ao esfíncter pilórico (estômago) incluem: *Bapx1*, *Nkx3.2*. E aqueles restritos ao mesoderma posterior (intestino delgado): *Wnt5a* e *Bmp4*. Cruzando o esfíncter pilórico pode-se encontrar: *Nkx2.5* e *2.3*. Adicionalmente, alguns fatores são expressos no endoderma igualmente de forma segregada. Anteriormente encontra-se: *Sox2* e *Six2*, posteriormente e ao nível do esfíncter pilórico: *CdxA* e *Pdx1*. Dessa forma, o tubo digestivo é especificado regionalmente muito inicialmente no desenvolvimento embrionário, mesmo antes de se ter um tubo formado. Ao mesmo tempo, endoderma e mesoderma expressam um grupo de fatores de transcrição que são regionalmente específicos para originar as diferentes estruturas com suas diferenças morfológicas e funcionais ao longo do tubo digestivo.

Portanto, é possível identificar esses domínios através da expressão gênica, de forma que os fatores de transcrição *Hhex*, *Sox2* e *Foxa2* são necessários para o desenvolvimento da porção anterior do tubo digestivo, enquanto os genes *Cdx*

são necessários para o desenvolvimento da região posterior e o posicionamento dos limites entre o que será anterior e posterior, fazendo destes, fatores cruciais para a identidade regional.

## 8.4 PADRONIZAÇÃO DORSO-VENTRAL DO TUBO DIGESTIVO

No início do desenvolvimento do tubo digestivo não existe polaridade no eixo dorso-ventral, fazendo um tubo circular simétrico. Nesta fase, *Shh* se encontra difusamente expresso no tubo digestivo no eixo dorso-ventral. Mais tarde, conforme se desenvolve a polaridade, existe uma mudança no padrão de expressão de *Shh* de tal forma que este passa a ser excluído do endoderma ventral nas regiões de ativa morfogênese, sugerindo que sinais ventrais inibem a expressão de *Shh* neste pólo do endoderma. Sinais que fazem surgir um pólo ventral são críticos no desenvolvimento dos derivativos do intestino anterior, incluindo a tireóide, pulmões, pâncreas e fígado. A polaridade no eixo dorso-ventral do tubo digestivo é uma importante função de ambos, endoderma e mesoderma e é absolutamente necessária para a formação adequada destes órgãos derivados do tubo digestivo inicial.

A especificação ventral do intestino anterior é necessária para a organogênese da tireóide e pulmões e envolve uma classe de genes que codificam fatores de transcrição contendo sequências homeobox relacionados ao gene *NK-2* encontrado em *Drosophila* (Kim e Nirenberg, 1989). Dentre estes genes o *Nkx2.1* tem sua expressão no intestino restrita a região ventral do endoderma do intestino anterior no ponto de brotamento da tireóide e dos pulmões, sendo crucial para o adequado desenvolvimento destes órgãos e essencial para a separação da traquéia do esôfago (Figura 8.1).

No desenvolvimento pancreático o endoderma evagina formando dois brotos na porção posterior do intestino anterior, um broto ventral e um broto dorsal. Estes brotos eventualmente se fusionam, o broto ventral predominantemente, se move dorsalmente com a rotação do intestino médio. O desenvolvimento pancreático normal requer a padronização específica do endoderma ventral e dorsal em uma região específica do eixo ântero-posterior. *Pdx-1*, outro fator de transcrição contendo homeobox, é necessário para este padrão dorso-ventral e está expresso no endoderma do intestino médio, no futuro endoderma duodenal nas regiões aonde ambos os brotos pancreáticos, dorsal e ventral, vão se formar. Sua expressão é excluída do endoderma lateral, onde se observa a expressão de *Shh*.

O desenvolvimento do fígado também requer polaridade dorso-ventral. Sinais ventrais são necessários para induzir o brotamento endodermal e a diferen-

ciação hepática. Desse modo, sinais inibitórios provenientes do mesoderma dorsal impedem a especificação ventral do fígado que é dada pelo mesoderma cardíaco. Mais de uma fonte de sinalização pode estar presente para ventralizar o tubo digestivo, incluindo sinais dorsais inibitórios do mesoderma e sinais estimulatórios ventrais do endoderma específico de cada região.

## 8.5 DIFERENCIAÇÃO DO TUBO DIGESTIVO NO EIXO DIREITO-ESQUERDO

Vertebrados demonstram uma simetria geral entre os lados direito e esquerdo do corpo do embrião e do adulto, porém, consistentes assimetrias existem neste eixo quando se trata de vísceras. Esta assimetria é evidenciada quando se observa o coração, o baço e o estômago à esquerda, e à direita, o fígado e a vesícula biliar. Adicionalmente, os pulmões pareados geralmente exibem diferenças entre os lobos direito e esquerdo. Os controles moleculares de assimetria direita-esquerda entre espécies animais pode ser um dos mais conservados entre todos os eventos de padronização (Schilling et al, 1999; Capdevila e Belmonte, 2000), embora existam algumas diferenças entre vertebrados (Schneider et al, 1999).

A primeira evidência de assimetria direita-esquerda no tubo digestivo envolve uma expansão para a esquerda na porção mais posterior do intestino anterior – o estômago. O estômago se torna localizado na região superior esquerda do abdômen, forçando o intestino médio a girar no sentido anti-horário, ajustando seu comprimento no abdômen.

As principais moléculas que controlam a padronização do eixo direito-esquerdo incluem *Shh* e *Activina* (Levin, 1997). A expressão de *Shh* é restrita ao lado esquerdo do embrião pela expressão de *Activina* à direita. O resultado da expressão restrita de *Shh* à esquerda é iniciar uma cascata de fatores expressos unilateralmente, incluindo *Nodal*, *Pitx2*, *Bapx1* (*Nkx3.2*) e *fgf8*. Se *Shh* for bilateralmente expresso ocorrerá uma randomização da localização dos órgãos. A localização assimétrica dos órgãos não é direcionada inteiramente como uma unidade, mas cada órgão é um interpretador independente dos eventos de sinalização de tal forma que a assimetria pode diferir dentro de um organismo entre, por exemplo, a posição do coração e a direção de rotação do intestino. Em geral, a assimetria direita-esquerda do tubo digestivo é controlada pelos fatores localizados à esquerda, ou seja, *Shh*, *Pitx2* e *Bapx1*. Existem evidências de que a bilateralização ou inativação destas moléculas leva a síndromes de heterotaxia (Levin, 1997; Izraeli et al, 1999).

## 8.6 DIFERENCIAÇÃO NO EIXO RADIAL

A linhagem endodermal do intestino é padronizada de acordo com seu mesoderma associado regionalmente, de modo que, em geral, o epitélio que desenvolve é único e específico para sua localização ao longo do eixo ântero-posterior do tubo digestivo. Se olharmos para o tubo digestivo como um tubo e fizermos um corte em qualquer região ao longo do eixo ântero-posterior, será possível observar que o epitélio e o mesoderma contêm um eixo radial que é padronizado de fora para dentro (da serosa para lúmen). A padronização mesodermal é dada por *Shh* e *Bmp4* no desenvolvimento do músculo liso. A padronização epitelial no eixo radial é evidenciada conforme o endoderma se diferencia e forma suas estruturas. No estômago, o endoderma invagina para dentro da submucosa e forma criptas e glândulas. No intestino médio, o endoderma evagina para dentro do lúmen e forma vilosidades. O intestino posterior tem ambos, criptas e vilosidades. As vilosidades polarizam ambos, o mesoderma e o epitélio, gerando um lado basal (a cripta na submucosa, se presente) e uma vilosidade no lúmen. As vilosidades são cobertas por um epitélio que difere na sua citodiferenciação por sua posição ao longo do eixo cripta-vilosidade. Em geral, a área da cripta contém menos células bem diferenciadas e proliferantes, uma vez que a vilosidade apresenta células diferenciadas e especializadas. A citodiferenciação epitelial ao longo do eixo radial é influenciada por interações com o mesoderma adjacente, interações com proteínas da membrana basal e o contato com alimento no lúmen (por exemplo, desenvolvimento de enzimas metabolizadoras de lactose pelas células epiteliais quando são expostas ao leite; Rings et al, 1994).

Os eventos de padronização no epitélio ao longo do eixo radial é o último a ocorrer durante o desenvolvimento e devido à habilidade regenerativa do epitélio do tubo digestivo, estes eventos de padronização continuam por toda a vida do organismo (Karam, 1999). Inicialmente, os eventos de padronização no eixo radial envolvem algumas das moléculas de sinalização previamente discutidas, incluindo *Shh*. A expressão de *Shh* no endoderma é simétrica ao longo do eixo ântero-posterior, mas apresenta ambas polaridades: dorso-ventral e radial. A polaridade radial é evidente desde o início do desenvolvimento deste eixo. Conforme as vilosidades e as glândulas se formam, a expressão de *Shh* é restrita às células progenitoras. Sua expressão diminui ao longo do eixo radial no lúmen ou nas glândulas submucosas conforme as células obtêm características de diferenciação específicas. No intestino delgado, *Shh* está expresso na base das vilosidades. Sua expressão é retida nas células endodermis não diferenciadas que podem ser descritas como aquelas remanescentes da posição original do lúmen do tubo. É interessante notar que *Shh* não é expresso nas células endodermis em regiões de

movimento ou diferenciação fora do lúmen original. Isso é evidente na morfogênese do brotamento dorso-ventral. Por exemplo, conforme o ducto coelestus e o ducto pancreático formam uma protuberância para fora do lúmen principal intestinal para formar os brotos dos órgãos (fígado e pâncreas), *Shh* não é expresso (Apelqvist et al, 1997; Narita et al, 1998).

## 8.7 PADRONIZAÇÃO DOS ÓRGÃOS

Após a especificação molecular do tubo digestório primitivo nas três regiões (intestino anterior, médio e posterior), inicia-se a diferenciação dos órgãos do sistema digestório humano. Esse processo inicia-se em torno da metade da quarta semana após a fertilização. Nesta fase, torna-se possível observar o início da dilatação do tubo digestivo no local aonde irá se formar o estômago. Subsequentemente, todos os órgãos do trato gastrointestinal serão formados dependendo de uma cascata molecular que culminará com o estabelecimento de um sistema digestório funcional (Bisset, 1991).

### 8.7.1 O INTESTINO ANTERIOR

O intestino anterior, principalmente a porção ventral, é responsável pela formação do esôfago, estômago, duodeno, fígado, pâncreas e do sistema hepatobiliar. Além dos órgãos do sistema digestório, o intestino anterior dará origem a importantes órgãos do sistema respiratório (pulmão e traquéia) e a tireóide.

A diferenciação inicia-se com a expressão do gene FGF2 que age como um morfógeno através de sinalização via MAP cinase, na região ventral do intestino anterior. Altas concentrações de FGF2 são responsáveis pela indução de *Nkx2.1*, que vão induzir os progenitores dos pulmões e da traquéia (Calmont, 2006). Concentrações moderadas de FGF2 induzem a expressão de albuminanos progenitores do fígado. Já baixas concentrações promovem a expressão do homeobox *Pdx1* na região ventral do pâncreas e do duodeno. Posteriormente, ações de moléculas específicas induzirão a diferenciação morfológica e funcional nos órgãos do trato gastrointestinal (Serls et al, 2005; Bort, 2004).

#### 8.7.1.1 FÍGADO

O fígado será formado na região do endoderma que está localizada próximo ao mesoderma cardíaco. A expressão de genes específicos do fígado (Albumina

e  $\alpha$ -fetoproteína) pode ocorrer em qualquer região do tubo digestivo primitivo desde que seja exposta a indução promovida pelo mesoderma cardíaco e seja inibida a indução promovida pela notocorda. Assim, a presença do tecido cardíaco promove o desenvolvimento do tecido hepático, enquanto a notocorda inibe a formação do fígado. A indução promovida pelas células cardíacas está ligada a FGFs secretados por essas células. Mas também é necessária a presença das células endoteliais dos vasos sanguíneos que estão na área ao redor da região hepática (Zaret, 2008).

Antes que o mesoderma induza a formação do fígado, é necessário que as células progenitoras hepáticas tornem-se competentes a responder aos sinais de FGFs provenientes do mesoderma cardíaco. Para isso, a região do endoderma do intestino anterior que formará o fígado tem que expressar fatores de transcrição da família “forkhead”. A expressão de *Foxa1* e *Foxa2* é necessária para que os nucleossomos sejam removidos das regiões genômicas específicas de genes chaves para a diferenciação hepática. Um desses genes é *HNF4 $\alpha$* , que é essencial para a diferenciação morfológica e bioquímica do broto hepático em fígado (Zhao & Duncan 2005). A perda de *HNF4 $\alpha$*  resulta na não formação do fígado e também desregula a arquitetura de tecidos vizinhos. Além disso, os genes da família “forkhead” são importantes para a diferenciação das ilhas endócrinas do pâncreas, regulando genes que estão envolvidos na secreção de insulina. Em 2004 foi demonstrado que a mutação no gene *HNF4 $\alpha$*  pode estar envolvida na diabetes tipo-2, evidenciando a importância da compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a diferenciação dos tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário para a melhor compreensão de processos patológico que afetam indivíduos adultos (Zorn, 2008).

### 8.7.1.2 PÂNCREAS

A formação do pâncreas ocorre no lado oposto à formação no fígado. Enquanto que para o desenvolvimento do fígado o coração tem função promotora e a notocorda previne a formação desse órgão, para o desenvolvimento do pâncreas, a ação desses órgãos mesodermiais é exatamente oposta. A notocorda age como ativador e o coração bloqueia a formação do pâncreas (Molotkov, 2005).

O pâncreas é originado a partir de duas distintas vesículas, uma dorsal e outra ventral, nas quais são induzidas por diferentes estruturas mesodermiais. A vesícula ventral do pâncreas é induzida na porção ventral do intestino anterior, que tem baixos níveis de sinalização de FGFs provenientes do mesoderma cardíaco. Já o desenvolvimento da vesícula dorsal requer a sinalização por AR e fatores secretados da notocorda, da aorta dorsal e da veia vitelínica. Os fatores secretados pela

notocorda incluem principalmente *Activina* e *Fgf2*, que irão reprimir a expressão de *Sonic Hedgehog (Shh)* no epitélio pancreático dorsal. *Shh* é expresso em todo o endoderma intestinal, exceto na região aonde originará o pâncreas. Na década de 90, alguns grupos mostraram que se *Shh* for expresso na região do pâncreas, o tecido formado é intestinal e não mais pancreático. Demonstrando a importância do bloqueio de *Shh* promovido por fatores secretados da notocorda para o desenvolvimento correto do pâncreas (Zorn e Wells, 2009). Esse bloqueio de *Shh* permite que a região pancreática seja capaz de responder a sinais provenientes da aorta. No local aonde o tubo digestivo encontra-se com a aorta e a veia vitelínica haverá a expressão de *Pdx1*. Além da expressão de *Pdx1*, as células pancreáticas também expressarão outros fundamentais fatores de transcrição, o *Ptf1a/p48* (na vesícula dorsal e ventral do pâncreas) e *Hoxb9* (apenas na vesícula dorsal). A expressão desses fatores em conjunto, mais a sinalização de Notch-Delta via o fator de transcrição *Ngn3* são requeridos para a formação das células endócrinas do pâncreas, responsáveis pela secreção de insulina. Já as células exócrinas, responsáveis pela produção de enzimas digestivas, são induzidas por *Pdx1* em conjunto com a sinalização de *Wnt* (Sherwood, 2009).

### 8.7.1.3 ESÔFAGO, ESTÔMAGO E DUODENO

Na região mais anterior do trato gastrointestinal será formado o esôfago. Para que o ele seja corretamente formado é necessário a expressão de *Shh* e *Sox2*, que além do papel no desenvolvimento do esôfago, irão estabelecer a fronteira entre estômago e esôfago (Que, 2006). O estômago será formado logo abaixo do esôfago e para que seja especificado, é necessária a expressão do fator de transcrição da família Homeobox, o gene *Barx1*, sendo expresso inicialmente na região do mesênquima estomacal, induzindo a expressão de dois genes da família de antagonistas de *Wnt*, que são secretados e apresentam domínios ricos em cisteína semelhantes ao encontrado no receptor Frizzled (*Fzld*), os genes *sFRP1* e *sFRP2*. Esses dois antagonistas bloqueiam a sinalização de *Wnt* apenas na região estomacal, pois a sinalização por *Wnt* é crítica para a formação do intestino, mas não é necessária para o desenvolvimento do estômago. Assim, a expressão de *Barx1* é de extrema importância para a formação do estômago, se ela for inibida, a região que se diferenciaria em estômago, passa a expressar marcadores intestinais (Kim 2005; Stringer 2008).

*Barx1* também regula a expressão mesenquimal de *Nkx3.2 (Bapx1)* que, em associação com *Nkx2.5* e *Sox9* (que são expressos no mesoderma anterior, induzido por *BMP4* proveniente do mesenquima intestinal), são fundamentais para a diferenciação do esfíncter pilórico, na porção posterior final do estômago. Além desse papel, *Nkx3.2* juntamente com *FGF10*, *Shh*, *Nkx2.5* e *Sox9* formam um

complexo regulatório que reprime localmente (região estomacal) a expressão de BMP, regulando o processo de looping (giro do estômago), fundamental para a correta morfologia e função do estômago (De Santa Barbara, 2005; Moniot 2004).

### 8.7.2 INTESTINO MÉDIO E POSTERIOR: DO INTESTINO AO COLÓN.

As duas últimas divisões do intestino primitivo, o intestino médio e o intestino posterior darão origem a estruturas como jejuno, íleo, intestino delgado (originados do intestino médio), intestino grosso, cólon e a porção urogenital do trato gastrointestinal (originados do intestino posterior). A específica interação epitélio-mesênquima que ocorre ao longo de todo o trato, é essencial para estabelecer os domínios de expressão gênica que regulará a formação de cada órgão (Sancho, 2004).

Inicialmente, fatores posteriorizantes como *Wnt*, *FGF4* e *Cdx* são ativados na região posterior, inibidos na região anterior e regulados finamente na região do intestino médio. Além disso, na região mais anterior do intestino médio é necessário que haja uma correta proporção entre a expressão de *Cdx* e *Pdx*, que será essencial para o desenvolvimento do duodeno. Se a relação *Cdx/Pdx* for alterada o duodeno não se formará, sendo substituído por tecidos intestinais. Nesse sentido, *FGF4* é fundamental para regular a correlação entre *Cdx/Pdx* (Melton, 2000).

Somando-se a ação de *FGF4*, genes da família *Wnt* também são fundamentais para o desenvolvimento das regiões do intestino médio e posterior. A sinalização canônica e não-canônica de *Wnt* é responsável por manter a expressão de *Cdx2* e inibir a expansão do marcador de intestino anterior, o gene *Sox2*. Algumas doenças humanas relacionadas com falhas no desenvolvimento do trato digestório estão relacionadas com a desregulação de *Wnt* e *Cdx*, que se expressos mais anteriormente levam a metaplasia intestinal. A expressão de *Cdx2* é necessária para iniciar o programa intestinal e bloquear o destino anterior. Assim, sua regulação é o ponto de convergência pelos quais as vias de sinalização regulam o desenvolvimento intestinal (Rubin, 2007).

Além de *Wnt*, *FGFs* e *Cdx*, outra família gênica importante para a formação do trato gastrointestinal é a família *Sonic*, que é constituída por *Sonic (Shh)*, *Indian (Ihh)* e *Desert (Dhh)*. *Shh* é expresso ao longo de todo o trato (exceto na região pancreática) e, junto com *Ihh*, induz a expressão de *Foxf1* no mesênquima intestinal, que regulará a sinalização de *Wnt* e a expressão de BMPs (Apelqvist, 1997).

A regulação dos genes *Hox* também é de extrema importância para o desenvolvimento do trato gastrointestinal, esses genes são expressos em precisos domínios ao longo do eixo ântero-posterior (Figura 8.1). Um dos mecanismos pelo qual FGF, *Wnt*, AR, *Pdx* e *Cdx* regulam a segmentação do tubo digestório é pela regulação da expressão de genes *Hox*. Por exemplo, enquanto o gene *Hoxa2*

é necessário para todo o trato digestório, *Hoxa13* e *Hoxd13* são co-expressos na parte mais distal do intestino posterior. Assim, se *Hoxa13* e *Hoxd13* for expresso irregularmente na região estomacal, esse tecido adquire propriedades epiteliais do intestino, da mesma forma que se *Hoxa13* e *Hoxd13* forem inibidos da porção distal, dramáticas máis-formações são observadas não somente no intestino, mas também no sistema urogenital (Kondo, 1996).

No desenvolvimento do intestino, primeiramente as células do endoderma são uniformes e formam um simples epitélio pseudostratificado. É necessária a transformação deste epitélio em uma madura mucosa intestinal com vilosidades e criptas. As vilosidades também são diferenciadas ao longo do eixo ântero-posterior, formando as vilosidades finas na região do intestino e as vilosidades grossas no cólon. A citodiferenciação e a formação das vilosidades requerem Wnt, BMPs e Cdx2, resultando na formação de diferentes tipos celulares que vão colonizar as regiões de criptas e vilosidades. No indivíduo adulto a sinalização de Wnt ainda é necessária para manter a população celular mais basal das criptas, essas células são indiferenciadas e proliferativas. A medida que elas migram para o ápice da cripta, perde-se a ativação de Wnt e as células se diferenciam (Benahmed, 2008; Dessimoz, 2006).

## 8.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A organogênese e o controle genético do desenvolvimento do endoderma vêm recebendo grande atenção nos últimos anos. A utilização de modelos animais, inicialmente embriões de galinha e recentemente camundongo mutantes, revelou muitos genes que regulam especificamente a citodiferenciação nos derivados endodermas. Assim, tem sido possível compreender como o trato digestivo primitivo, um tubo único e oco, torna-se padronizado em diferentes órgãos e tecidos que exercem funções distintas e específicas no indivíduo adulto.

A compreensão da regulação molecular que promove o desenvolvimento animal propiciará importantes avanços científicos, abrindo novas oportunidades para intervenções terapêuticas de diversas doenças humanas que debilitam o sistema gastrointestinal embrionário e adulto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APELQVIST, A.; AHLGREN, U.; EDLUND, H. Sonic hedgehog directs specialized mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* 7: 801-804, 1997.

- BENAHMED, F.; GROSS, I.; GAUNT, S. J.; BECK, F.; JEHAN, F. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse *Cdx2* homeobox gene. *Gastroenterology*. 135: 1238–47, 2008.
- CAPDEVILA, I.; BELMONTE, J. C. Knowing left from right: the molecular basis of laterality defects. *Mol. Med. Today*. 6: 112–118, 2000.
- BISSET, W. M. Development of intestinal motility. *Arch. Dis. Child*. 66:3, 1991.
- BORT, R.; MARTINEZ-BARBERA, J. P.; BEDDINGTON, R. S.; ZARET, K. S. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development*. 131: 797–806, 2004.
- CALMONT, A.; WANDZIOCH, E.; TREMBLAY, K. D.; MINOWADA, G.; KAESTNER, K. H. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev. Cell*. 11: 339–48, 2006.
- DE SANTA BARBARA, P.; WILLIAMS, J.; GOLDSTEIN, A. M.; DOYLE, A. M.; NIELSEN, C. Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Dev. Dyn*. 234: 312–22, 2005.
- DESSIMOZ, J.; OPOKA, R.; KORDICH, J. J.; GRAPIN-BOTTON, A.; WELLS, J. M. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech. Dev*. 123: 42–55, 2006.
- GRAPIN-BOTTON, A.; MELTON, D. A. Endoderm development from patterning to organogenesis. *TIG*. 16: 124–130, 2000.
- HAFKEN, K.; LACROIX, B.; KEDINGER, M.; SIMON-ASSMAN, P. M. Inductive properties of fibroblastic cell cultures derived from rat intestinal mucosa on epithelial differentiation. *Differentiation*. 23: 226–233, 1983.
- IZRAELI, S.; LOWE, L. A.; BERTNESS, V. L.; GOOD, D. J.; DORWARD, D. W.; KIRSCH, I. R.; KUEHN, M. R. The *SIL* gene is required for mouse embryonic axial development and left-right specification. *Nature*. 399: 691–694, 1999.
- KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y.; GAD, J. M.; TAJIMA, Y.; TAYA, C. *ET AL.* Depletion of definitive gut endoderm in *Sox17* –null mutant mice.

**Development.** 129: 2367-79, 2002.

KARAM, S.M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. **Front. Biosci.** 4: D286-D298, 1999.

KEDINGER M.; SIMON-ASSMAN, P. M.; LACROIX, B.; MARXER, A.; HAURI, H. P.; HAFFEN, K. Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. **Dev. Biol.** 113: 474-483, 1986.

KEDINGER M.; SIMON-ASSMAN, P. M.; BOUZIGES, F.; HAFFEN, K. Epithelial-mesenchymal interactions in intestinal epithelial differentiation. **Scand. J. Gastroenterol.** 23: 62-69, 1988.

KIM, Y.; NIRENBERG, M. Drosophila NK-homeobox genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 7716-7720, 1989.

KIM, B. M.; BUCHNER, G.; MILETICH, I.; SHARPE, P. T.; SHIVDASANI, R. A. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. **Dev. Cell.** 8: 611-22, 2005.

KONDO, T.; DOLLE, P.; ZAKANY, J.; DUBOULE, D. Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. **Development.** 122: 2651-2659, 1996.

LE DOUARIN, N. Etude experimentale de l'organeogenese Du tube difestif et Du foie chez l'embryon de poulet. **Bull Biol. Fr. Belg.** 98: 533-676, 1964.

LEVIN, M.; PAGAN, S.; ROBERTS, D. J.; COOKE, J.; KUEHN, M. R.; TABIN, C. J. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. **Dev. Biol.** 189: 57-67, 1997.

LEVIN, M. Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. **Bioessays.** 19: 287-296, 1997.

MELTON, D. A.; GRAPIN-BOTTON, A. Endoderm development from patterning to organogenesis. **TIG.** 16: 3, 2000.

MOLOTKOV, A.; MOLOTKOVA, N.; DUESTER, G. Retinoic acid generated

- by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev. Dyn.* 232: 950–57, 2005.
- MONIOT, B.; BIAU, S.; FAURE, S.; NIELSEN, C. M.; BERTA, P. SOX9 specifies the pyloric sphincter epithelium through mesenchymal-epithelial signals. *Development.* 131: 3795–804, 2004.
- NARITA, T.; ISHII, Y.; NOHNO, T.; NOJI, S.; YASUGI, S. Sonic hedgehog expression in developing chicken digestive organs is regulated by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Growth. Differ.* 40: 67-74, 1998.
- QUE, J.; CHOI, M.; ZIEL, J. W.; KLINGENSMITH, J.; HOGAN, B. L. Morphogenesis of the trachea and the esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. *Differentiation.* 74: 422-37, 2006.
- RINGS, E. H. H. M.; KRASINSKI, S. D.; VAN BEERS, E. H.; MOORMAN, A. F. M.; DEKKER, J. *ET AL.* Restriction of lactase gene expression along the proximal-to-distal axis of rat small intestine occurs during postnatal development. *Gastroenterology.* 106: 1223-1232, 1994.
- ROBERTS, D. J.; JOHNSON, R. L.; BURKE, A. C.; NELSON, C. E.; MORGAN, B. A.; TABIN, C. Sonic Hedgehog is an endodermal signal inducing BMP-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development.* 121: 3163-3174, 1995.
- ROBERTS, D. J. Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Developmental Dynamics.* 219: 109-120, 2000.
- RUBIN, D. C. Intestinal morphogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23: 111–14, 2007.
- SANCHO, E.; BATLLE, E.; CLEVERS, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 695–723, 2004.
- SCHILLING, T. F.; CONCORDET, J. P.; INGHAM, P. W. Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev. Biol.* 210: 277-287, 1999.

- SCHNEIDER, A.; MIJALSKI, T.; SCHLANGE, T.; DAI, W.; OVERBEEK, P.; ARNOLD, H. H.; BRAND, T. The homeobox gene *nkx32* is a target of left-right signaling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. **Curr. Biol.** 9: 911-914, 1999.
- SERLS, A. E.; DOHERTY, S.; PARVATIYAR, P.; WELLS, J.M.; DEUTSCH, G. H. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. **Development.** 132: 35-47, 2005.
- SHERWOOD, R. I.; CHEN, T. Y.; MELTON, D. A. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. **Dev. Dyn.** 238: 29-42, 2009.
- SPENCE, J. R.; WELLS, J. M. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. **Dev. Dyn.** 236: 3218-27, 2007.
- STAINIER, D. Y. A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. **Genes Dev.** 16: 893-907.
- STRINGER, E. J.; PRITCHARD, C. A.; BECK, F. *Cdx2* initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. **FEBS Lett.** 582: 2555-60, 2008.
- WELLS, J. M.; MELTON, D. A. Vertebrate endoderm development. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 15: 393-410, 1999.
- ZARET, K. S. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. **Nat. Rev. Genet.** 9: 239-40, 2008.
- ZHAO, R.; DUNCAN, S. A. Embryonic development of the liver. **Hepatology.** 41: 956-67, 2005.
- ZORN, A. M.; WELLS, J. M. Molecular basis of vertebrate endoderm development. **Int. Rev. Cytol.** 259: 49-111, 2007.
- ZORN, A. Liver development. **Stembook.** Ed The Stem Cell Research Community, 2008.
- ZORN, A. M.; WELLS, J. M. Vertebrate endoderm development and organ formation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 25: 221-51, 2009.