

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA PORTUGAL PORTELLA

**ANÁLISE DAS MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS VIAS
DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES
DE AVES (*Gallus gallus*)**

CURITIBA

2006

ANA CAROLINA PORTUGAL PORTELLA

**ANÁLISE DAS MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS VIAS
DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES
DE AVES (*Gallus gallus*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cloris Ditzel Faraco

CURITIBA

2006

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Dr. Cloris Ditzel Faraco
Orientadora (Depto. Biologia Celular - UFPR)



Dr. Silvio Sanches Veiga
Depto. Biologia Celular - UFPR



Dr. Silvio Marques Zanata
Depto. Patologia Básica - UFPR

após argüir o(a) mestrando(a) **Ana Carolina Portugal Portella** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "Análise das moléculas de matriz extracelular nas vias de migração das células de crista neural em embriões de aves (*Gallus gallus*)", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 30 de março de 2006



Célia Regina Cavichiolo Franco
Coordenadora do Curso

Dedico este trabalho especialmente á amiga e orientadora Cloris, por todos os momentos de compreensão, apoio e paciência durante estes anos. Muito obrigada por sua confiança e por ter me dado tantas oportunidades, todas da minha vida!

AGRADECIMENTOS

1. Agradeço a Deus, por ter me concedido saúde, paciência e perseverança para terminar este trabalho.
2. Especialmente a minha avó Leda, pelo seu amor e carinho, e pela oportunidade que me deu de chegar à universidade. Tudo que sou hoje devo a ela. Saudades...
3. A minha família, em especial a minha mãe Ana Marilis e minha tia Mílcea que por tantos finais de semana me acompanharam nos experimentos.
4. Ao meu noivo Fabio pelo seu amor, paciência e apoio incondicional durante a realização deste trabalho.
5. A Mary, pelo apoio e compreensão, principalmente durante as últimas semanas do trabalho.
6. A amiga Prof.^a Lea Borges, pela amizade, pelo incentivo, apoio, e por acreditar no meu potencial.
7. Aos colegas de trabalho Aliete, Priscila, Erivan e Juliana por serem tão compreensivos, pacientes e amigos nos momentos de dificuldade.
8. A todas as colegas do laboratório de Biologia do desenvolvimento da UFPR, por todos os bons momentos compartilhados.
9. A Prof.^a Cecília Beatriz, por seus ensinamentos de histologia que me ajudaram a ingressar no mestrado.
10. Aos professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelos ensinamentos tão importantes para minha formação.

**“Se Deus fez um mundo de tantas
belezas foi para que sejamos felizes!”**

Baden Powell

RESUMO

Após o fechamento do tubo neural, células da crista neural segregam-se da porção dorsal do tubo e migram por duas vias; a via ventral entre o somito e o tubo neural originando gânglios simpáticos e sensoriais, células de Schwann e células cromafins; e a via dorsolateral, originando melanócitos. Algumas moléculas parecem impedir a entrada de células da crista em somitos posteriores e em alguns sítios do tronco do embrião como por exemplo o espaço perinotocordal. Estas moléculas são o condroitin sulfato, colágeno II, colágeno IX e ácido hialurônico, que além de repelirem células de crista neural, estão envolvidas com a condrogênese. Foram realizados estudos para analisar a presença ou ausência destas moléculas nas vias de migração de embriões de ave nos estágios 22, 24, 26 e 28 HH das raças Sedosa Japonesa (SB) e White Leghorn (WL). Embriões da raça SB apresentam um padrão diferenciado de migração das células de crista neural precursoras de melanócitos, elas invadem a via ventral e colonizam regiões ventrais. Já embriões da raça WL possuem o padrão normal de migração para as células de crista neural. Embriões da raça WL possuem uma expressão maior de condroitin sulfato, colágeno IX e ácido hialurônico no espaço perinotocordal e na via ventral de migração que embriões de SB. A presença do colágeno II, ocorre somente em embriões da raça WL nos estágios 26 e 28 HH. Já a fibronectina está presente na via dorsolateral de ambas as raças e também na via ventral de embriões da raça SB, parecendo inibir a condrogênese. Estes dados sugerem que a formação da precartilagem das vértebras ocorre antes em embriões da raça WL e que, as moléculas de matriz extracelular de cartilagem são uma barreira química para as células de crista neural. Palavras-chave: Crista Neural. Migração Celular. Ácido Hialurônico. Condroitin Sulfato.

ABSTRACT

After the neural tube closure, neural crest cells segregate to the dorsal portion of neural tube and migrate through two pathways: the ventral, between the somite and neural tube, giving rise to sensorial and sympathetic ganglia, Schwann and cromaffins cells; and the dorsolateral originating melanocytes. Some molecules seem to block the entrance of neural crest cells in the posterior somites and other regions in the embryo, for example the perinotochordal space. These molecules are chondroitin sulfate, collagen II, collagen IX, and hialuronic acid, that besides repelling neural crest cells, are involved in chondrogenesis. The absence or presence of these molecules in the migration ways, was analyzed in stages 22, 24, 26 and 28 HH Silky chicken (SB) and White Leghorn (WL) embryos . SB embryos have a different pattern for melanoblast migration: as well as going dorsolaterally, these cells invade the ventral way and colonize ventral regions. WL embryos melanoblasts have the normal pattern of neural crest cells migration. WL embryos have more chondroitin sulfate, collagen IX and hialuronic acid in the perinotochordal space and in the ventral way than SB embryos. Collagen II appears only in WL embryos at stages 26 and 28 HH. Fibronectin is in the dorsolateral pathway in both strains and in the ventral as well in SB embryos, where it may inhibit chondrogenesis. These data suggest that the precartilage formation occurs earlier in WL embryos than in SB embryos and that the extracellular matrix of cartilage can act as a barrier to the neural crest cells.

Key words: Neural Crest. Cell Migration. Hialuronic Acid. Chondroitin Sulfate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- ILUSTRAÇÃO nº. 1** - CLIVAGEM, FORMAÇÃO DO EPIBLASTO E HIPOBLASTO, MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA. (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....14
- ILUSTRAÇÃO Nº. 2** - MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DO EPIBLASTO PARA O INTERIOR DA BLASTOCELE ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA. NÓ DE HENSEN. (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....15
- ILUSTRAÇÃO Nº. 3** - REGRESSÃO DO NÓ DE HENSEN, FORMAÇÃO DA PREGA CEFÁLICA, TUBO NEURAL E SOMITOS. (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....16
- ILUSTRAÇÃO Nº. 4** - SINAIS DO TUBO NEURAL E DA NOTOCORDA PARA DIFERENCIAÇÃO DOS SOMITOS (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....18
- ILUSTRAÇÃO Nº. 5** - SOMITO: DERMÁTOMO (D), MIÓTOMO (M) E ESCLERÓTOMO (E). (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....18
- ILUSTRAÇÃO Nº 6** - VIAS DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL. 1 - VIA DORSOLATERAL. 2 - VIA VENTRAL. (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....21
- ILUSTRAÇÃO Nº 7** – ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO DE AVE. (FONTE: WOLPERT ET AL., 2000).....29

LISTA DE FOTOGRAFIAS

- FOTOGRAFIA 1** - SOMITO ANTERIOR DE EMBRIÕES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 24, 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO HH. MORFOLOGIA COLORAÇÃO HEMATOXILINA – EOSINA.....34
- FOTOGRAFIA 2** - SOMITOS ANTERIORES E POSTERIORES DE EMBRIÕES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 26 DO DESENVOLVIMENTO. TRATAMENTO COM HIALURONIDASE E COLORAÇÃO COM ALCIAN BLUE.....36
- FOTOGRAFIA 3** - EMBRIÕES DE AVE DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 22 E 24 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO CONDRITIN SULFATO.....38
- FOTOGRAFIA 4** - EMBRIÕES DE AVE DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO CONDRITIN SULFATO.....39
- FOTOGRAFIA 5** - EMBRIÕES DE AVE DA RAÇA WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIO 24, 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO CONDRITIN SULFATO NA VIA VENTRAL.....40
- FOTOGRAFIA 6** - EMBRIÃO DA RAÇA WHITE LEGHORN NO ESTÁGIO 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO CONDRITIN SULFATO ACIMA DO TUBO NEURAL.....40
- FOTOGRAFIA 7** - EMBRIÕES DE AVE DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO COLÁGENO IX.....42
- FOTOGRAFIA 8** - EMBRIÕES DE AVE DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NO ESTÁGIOS 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO COLÁGENO IX NA VIA VENTRAL.....43
- FOTOGRAFIA 9** - EMBRIÕES DE AVE DA RAÇA WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO. EXPRESSÃO DO COLÁGENO II.....43
- FOTOGRAFIA 10** - EMBRIÕES DE AVE DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN NOS ESTÁGIOS 26 E 28 DO DESENVOLVIMENTO..44

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP – Proteína morfogenética de osso.

BSA – Soroalbumina bovina.

GRD – Gânglio de raiz dorsal.

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

NT – Notocorda.

PBS – Salina tamponada com fosfato.

PNA – Lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*)

TN – Tubo neural.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 OBTENÇÃO DOS OVOS.....	29
3.2 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES.....	29
3.3 INCLUSÃO EM PARAPLAST.....	29
3.4 MICROTOMIA EM PARAPLAST.....	30
3.5 INCLUSÃO EM GELATINA.....	30
3.6 CRIOMICROTOMIA.....	30
3.7 COLORAÇÃO HEMATOXILINA - EOSINA.....	31
3.8 CITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	31
3.9 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE COLÁGENO TIPO II.....	31
3.10 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CONDROITIN SULFATO, COLÁGENO TIPO IX E FIBRONECTINA.....	32
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	33
4.1 MORFOLOGIA DO TRONCO DE EMBRIÕES DA AVE DAS RAÇAS WHITE LEGHORN E SEDOSA JAPONESA.....	33
4.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO HIALURÔNICO NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN.....	35
4.3 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CONDROITIN SULFATO NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN.....	37
4.4 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO IX NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN.....	41
4.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO II NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN.....	43

4.6 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO II NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN.....	44
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Embrões de ave são muito semelhantes aos embrões de mamíferos na complexidade morfológica e no curso geral do desenvolvimento, porém são de mais fácil obtenção e observação. O óvulo é fertilizado e o processo de clivagem inicia-se ainda no oviduto da galinha, resultando em um disco de células chamado blastodisco ou blastoderme. A camada de células superior é o epiblasto que dará origem ao embrião propriamente dito e a camada inferior, o hipoblasto dará origem a estruturas extraembrionárias.

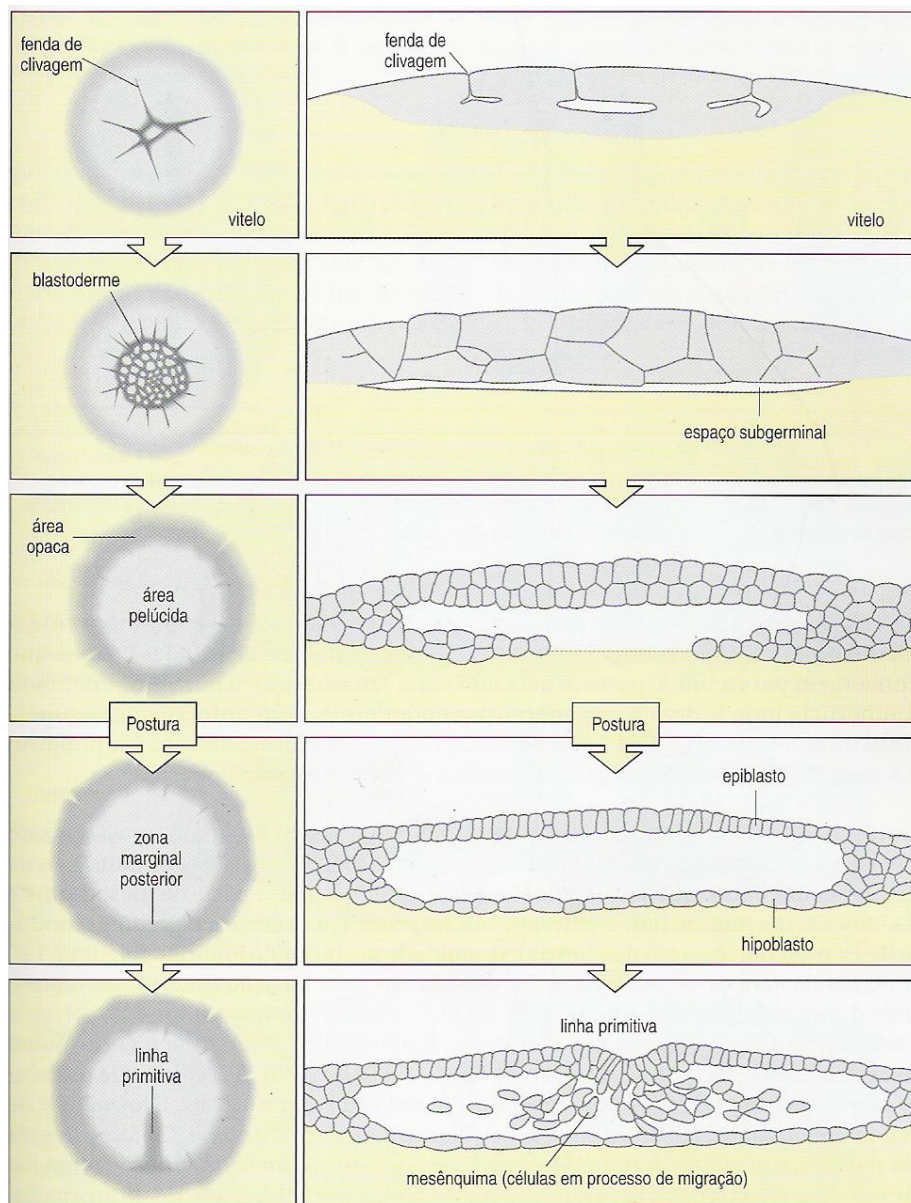


ILUSTRAÇÃO nº. 1

Clivagem, formação do epiblasto e hipoblasto, migração das células mesenquimais através da linha primitiva.

(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

A região central da blastoderme, situada sobre uma cavidade (blastocelo), é translúcida quando observada de cima, portanto denomina-se área pelúcida, já a região mais externa da blastoderme, onde as células estão sobrepostas torna-se mais escura, sendo então chamada de área opaca. Há um espessamento de células no epiblasto, chamado de zona marginal posterior. Estas células vão definir tanto o lado dorsal quanto a extremidade posterior do embrião. O início da gastrulação é marcado pelo desenvolvimento da linha primitiva, que inicialmente é visualizada como uma faixa mais densa estendendo-se da zona marginal superior até a região central da área pelúcida. É através da linha primitiva que as células do epiblasto, proliferando e migrando para o interior da blastocelo, vão posteriormente dar origem a células mesodérmicas e endodérmicas. Durante a gastrulação, na extremidade anterior da linha primitiva forma-se uma condensação de células, denominada nó de Hensen.

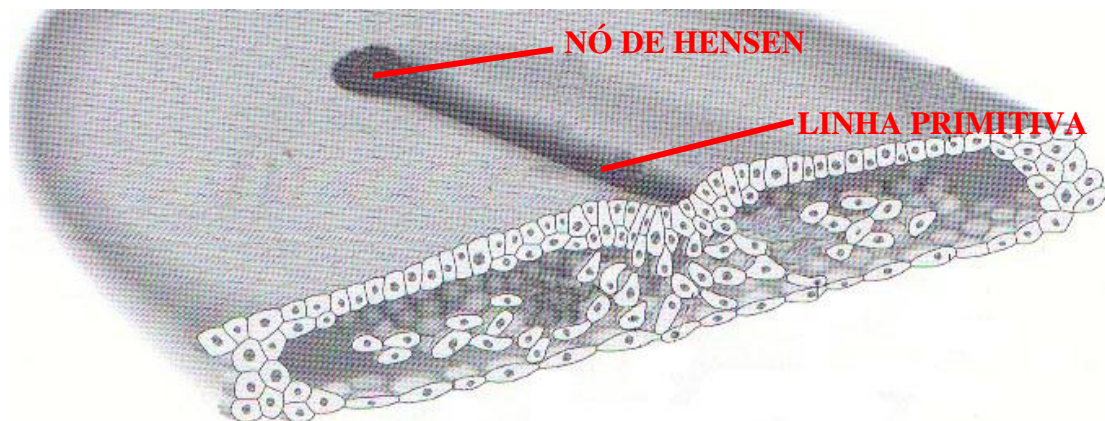


ILUSTRAÇÃO nº. 2

Migração das células do epiblasto para o interior da blastocelo através da linha primitiva. Nó de Hensen.

(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

Quando a maior parte das células que originarão a mesoderme e endoderme migrou para o interior da blastocelo, a linha primitiva começa a regredir e o nó de Hensen move-se em direção à extremidade posterior do embrião. A região cefálica do embrião é demarcada anteriormente ao nó de Hensen, na extremidade anterior do embrião por uma dobra da blastoderme composta por ectoderme e endoderme. As células que migram do nó de Hensen enquanto este está regredindo darão origem à notocorda e contribuirão para a formação dos somitos. À medida que o nó de Hensen

regride, a notocorda e os somitos vão se formando anteriormente a ele, sendo que um par de somitos é formado a cada hora, aproximadamente (Wolpert et al., 2000). O tubo neural começa a se desenvolver como um par de pregas da ectoderme, enquanto a notocorda está se formando. O dobramento e o fechamento do tubo neural começam na extremidade anterior para a posterior.

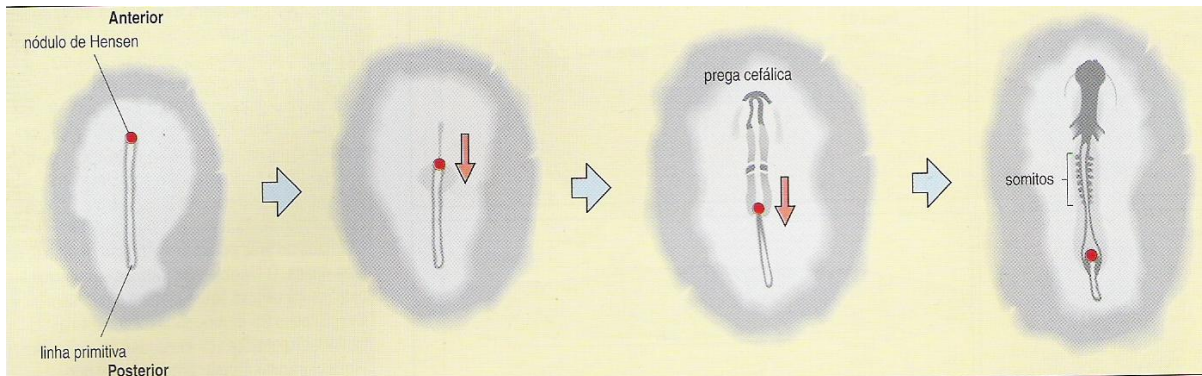


ILUSTRAÇÃO nº. 3

Regressão do nó de Hensen, formação da prega cefálica, tubo neural e somitos.
(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

Uma vez estabelecidos os somitos, a próxima mudança morfológica vem de sinais indutivos emanados do tubo neural e notocorda. Sinais dorsalizantes vindos do tubo neural e sinais ventralizantes vindos da notocorda competem entre si, especificando o dermomiótomo e o esclerótomo respectivamente (Spence et al., 1996). A placa mesodérmica que dá origem aos somitos sofre a diferenciação mesmo quando isolada juntamente com os tecidos epiteliais circundantes, seja em cultivo ou em transplantes, e a ordem crânio-caudal é mantida mesmo quando a placa é invertida (Christ; Huang & Wilting, 2000). Quando a placa mesodérmica é cultivada sem contato com nenhum tecido, a formação dos somitos não ocorre e as células tornam-se mesenquimais, sugerindo que a segmentação da mesoderme paraxial em somitos pode ser modulada por estruturas circundantes.

Alguns fatores de crescimento também parecem estar envolvidos com a formação dos somitos. Na região posterior da placa mesodérmica o fator de crescimento FGF-8 é fortemente expressado, enquanto que na região anterior, há altos níveis de FGFR1 (Yamaguchi et al., 1994). Embriões de

camundongos com deficiência para FGFR1 não formam somitos. A sinalização por fatores de crescimento pode promover um controle para a proliferação das células mesenquimais da placa mesodérmica, antero-posteriormente. O controle da segmentação da placa mesodérmica é realizado através de genes como *mesp1*, *2*, e *ephA4*, que estão envolvidos na polarização crânio-caudal da segmentação da placa (Christ & Ordahl, 1995).

Um mecanismo molecular de controle da formação dos somitos pode também ser observado: a cada 90 minutos em embriões de ave o gene *c-hairy-1* é expressado nas células da mesoderme paraxial que vai formar os somitos. A expressão deste gene ocorre como uma onda e é iniciada durante formação de cada somito. O gene *lunatic fringe* também é expresso durante a formação dos somitos da mesma maneira que o *c-hairy-1*. A diferenciação da placa mesodérmica pode ser consequência de um número de ciclos de expressão de *c-hairy-1* ou *lunatic fringe*, através de sinais emanados de estruturas circundantes (Palmeirin et al., 1997). Morfologicamente a maturação da placa mesodérmica é caracterizada pela condensação de células e transição destas células de mesenquimais para epiteliais. Esta epiteliação requer a expressão de um gene denominado *paraxis*. Estudos demonstraram que a expressão deste gene e a formação dos somitos requerem sinais da superfície da ectoderme e tubo neural (Burgess et al., 1996). O controle da formação das estruturas dos somitos parece envolver também os genes da família *pax*. Cada somito formado consiste de uma bola de células epiteliais colunares com suas faces apicais voltadas para fora, e com o interior preenchido por células mesenquimais. Em somitos recém formados há uma expressão do gene *pax-3*, sendo que logo em seguida há uma regulação negativa na expressão deste gene nas células mesenquimais do interior do somito e nas células epiteliais da região ventral do somito, que por sua vez começam a expressar o gene *pax-1*. A expressão do gene *pax-1* pela porção ventral do somito, precede a transição epitélio-mesenquimal das células, que nada mais é do que a formação do esclerótomo (Muller et al., 1996). Cada somito diferencia-se em três partes distintas: o dermatomo, o

miótomo e o esclerótomo. O esclerótomo localiza-se mais ventralmente e suas células possuem características mesenquimais; elas convergem em direção à notocorda, envolvendo-a, e mais tarde dão origem à coluna vertebral (vértebras e discos intervertebrais). O tamanho do esclerótomo depende do equilíbrio entre sinais dorsais e ventrais. Sinais dorsais que promovem o desenvolvimento do dermomiótomo e inibem a formação do esclerótomo são derivados da superfície dorsal do tubo neural, controlados pela expressão de genes da família *wnt*, já um equilíbrio entre sinais vindos da notocorda e da mesoderme (*Noggin*, *Shh* e *BMPs*) desempenham um importante papel na formação do esclerótomo (McMahon et al.,1998). A formação de diferentes regiões no somito, também é controlada por sinais vindos de estruturas adjacentes como o tubo neural e a notocorda.

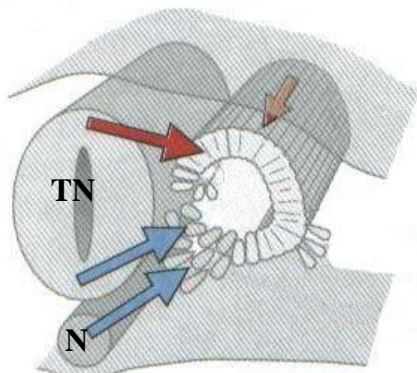


ILUSTRAÇÃO nº. 4

Sinais do tubo neural e da notocorda para diferenciação dos somitos
(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

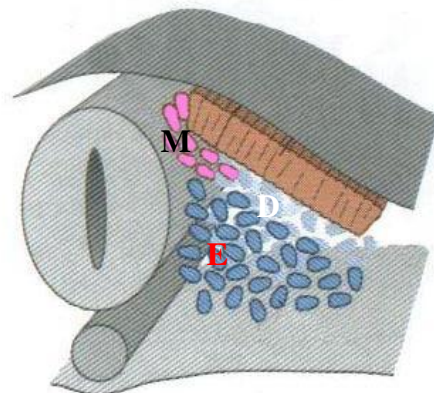


ILUSTRAÇÃO nº. 5

Somito: dermatômo (D), miótomo (M) e esclerótomo (E).
(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

Durante a formação do esclerótomo a parte dorsolateral do somito paralela à ectoderme tem seus limites definidos e suas características epiteliais mantidas. Esta porção do somito é denominada dermatômo, e suas células vão contribuir para a formação das camadas profundas da derme. A parte dorso-medial do somito, localizada entre o dermatômo e o esclerótomo, é denominada miótomo. As células do miótomo passam por um crescimento mais extensivo do que células de qualquer outra parte do somito. Elas vão dar origem à musculatura esquelética de todo o corpo, exceto dos músculos das regiões cefálicas e branquiais que têm origem do mesênquima da cabeça (Wolpert et al.,2000; Patten,1957).

Logo após o fechamento do tubo neural, uma população de células segrega-se de sua porção dorsal. Esta população de células é conhecida como crista neural. Embora a crista neural seja constituída inicialmente por poucas células e permaneça pouco tempo no desenvolvimento embrionário, sua capacidade migratória, proliferativa e a pluripotencialidade de suas células é realmente impressionante. A análise da crista neural engloba quase todas as características do desenvolvimento tais como determinação, migração direcionada e diferenciação celular, sendo ela portanto, um ótimo modelo para estudos. (Le Douarin & Kalcheim,1999)

As células de crista neural distinguem-se das células do tubo neural, pois sofrem transformação de epitélio para mesênquima. Esta transformação é acompanhada por mudanças morfológicas e moleculares que incluem a perda da morfologia neuroepitelial e aquisição de capacidade migratória. Para tanto, há uma alteração nas moléculas de adesão celular das células de crista neural, que inicia antes mesmo delas delaminarem do tubo neural (Krull,2000). Vários fatores são essenciais para o início da migração das células da crista neural, como por exemplo, a perda da lamina basal que circunda o tubo neural permitindo a saída das células da crista neural. Uma hipótese é que a lamina basal seja descontínua na região dorsal do tubo neural onde as células da crista neural se localizam (Martins-Green and Erickson,1987). A migração das células da crista neural é um processo altamente complexo, que depende tanto de espaço quanto de tempo, e leva as células através de caminhos definidos para seus destinos finais. A deposição de um substrato no qual as células de crista neural sejam hábeis a migrar também é necessária.

Estabelece-se também claramente uma regionalização antero-posterior no somito em formação. A compartimentalização de porções anteriores e posteriores nos somitos é indispensável para o desenvolvimento da coluna vertebral e para o desenvolvimento do sistema nervoso periférico. Estudos demonstraram que axônios de neurônios motores e células da crista neural que formam o gânglio de raiz dorsal, invadem somente os somitos anteriores,

sendo que os somitos posteriores agem como uma barreira contra a invasão de axônios e células da crista neural (Newgreen et al.,1990). Algumas moléculas são expressadas no somito posterior e parecem agir como uma barreira química para as células de crista neural. Proteoglicanos ricos em condroitin-6-sulfato são expressados no somito posterior de aves durante a migração de células de crista neural (Perris,1991). Uma outra evidência de que estes proteoglicanos possuem um papel inibidor para a migração de células de crista neural é a presença destas moléculas na matriz perinotocordal, que é evitada pelas células de crista que migram pela via ventral (Perris et al.,1993b). Embriões de aves que tiveram suas notocordas transplantadas e cultivadas, tratadas pela condroitinase ABC demonstraram uma atenuação na capacidade inibidora para a migração de células da crista neural (Newgreen et al.,1986), confirmando a capacidade inibidora de proteoglicanos ricos em condroitin sulfato. O colágeno IX é um proteoglicano rico em condroitin sulfato e também é expressado nos somitos posteriores de embriões de aves enquanto as células de crista neural estão migrando (Ring et al.,1996). Células de crista neural também evitam um substrato de colágeno IX *in vitro*, sugerindo que esta molécula pode agir de maneira inibidora *in vivo* (Oakley & Tosney,1991). Moléculas ligantes a PNA são observadas na via dorsolateral do tronco de embriões de ave durante a migração de células da crista neural pela via ventral, e é observada uma diminuição destas moléculas na via dorsolateral quando as células de crista neural estão migrando por esta via (Krull,2001).

No início da diferenciação do esclerótomo as células encontram-se compactadas adjacentes ao dermomiótomo. O espaço perinotocordal contém matriz extracelular que conecta as células esclerotomais com a lamina basal da notocorda e funciona como um substrato para a invasão destas células do esclerótomo. As células do esclerótomo do somito colonizam o espaço perinotocordal e perdem suas características mesenquimais, elas proliferam-se e formam um tubo que envolve a notocorda, formando o corpo das vértebras e os discos intervertebrais. Este processo requer sinalização da

notocorda e como conseqüência tem a expressão do gene *pax-1* nas células do esclerótomo. O início da formação da cartilagem pode ser visualizado através de imunocitoquímica para o proteoglicano condroitin-6-sulfato. Outros proteoglicanos e proteínas como o colágeno tipo II e a tenascina podem ser utilizados para identificar a condrogênese (Christ, Huang & Wilting,2000).

As células da crista neural podem migrar através de dois caminhos: a via ventral que se localiza entre os somitos e o tubo neural, sendo que as células passam por entre a mesoderme somítica; e a via dorsolateral entre os somitos e a ectoderme.

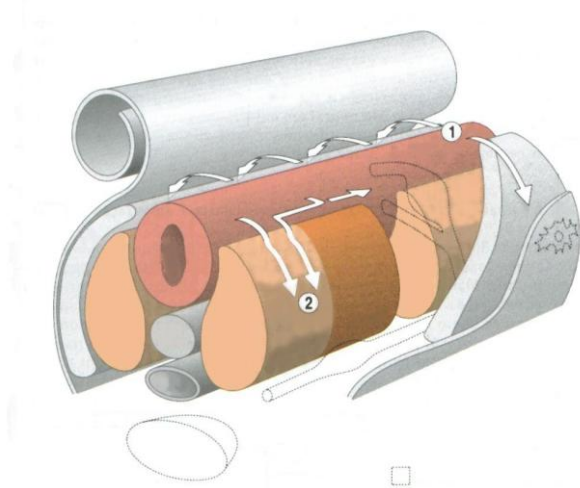


ILUSTRAÇÃO nº 6

Vias de migração das células da crista neural. 1

Via dorsolateral. 2 Via ventral.

(Fonte: WOLPERT et al., 2000)

Pouco antes da entrada de células de crista neural nos somitos na via ventral, eles organizam-se em dermatômo, miótomo e esclerótomo, o que pode estimular esta entrada. A lamina basal do miótomo surge junto com a entrada das células tendo sido descrito uma interação entre as células de crista neural e a matriz extracelular que forma a lamina basal do miótomo. As células de crista neural alteram dramaticamente a sua trajetória quando contactam a lamina basal do miótomo, voltando-se lateralmente e alinhando-se com a superfície basal do miótomo. Uma ausência quase abrupta de lamina basal no miótomo coincide com o local onde as células divergem para dentro do esclerótomo (Erickson et al.,1994). As células de crista neural que migram pela via ventral contribuem para a formação dos gânglios simpáticos e sensoriais, células de Schwann e células cromafins. As células que migram por esta via migram de maneira segmentada, ou seja, atravessam somente a

mesoderme do esclerótomo do somito anterior, evitando o somito posterior. Já as células de crista neural que migram uniformemente pela via dorsolateral dão origem a melanócitos, sem o padrão segmentar das células da via ventral. A migração pela via ventral ocorre aproximadamente 24 horas antes da migração pela via dorsolateral. Duas moléculas estão envolvidas no impedimento da entrada de células da crista neural na via dorsolateral no momento em que a migração ocorre pela via ventral: glicoproteínas ligantes a lectina de amendoim (PNA) e condroitin-6-sulfato. Vários estudos foram feitos com diferentes moléculas de matriz extracelular para um melhor entendimento da maneira organizada e segmentar da migração das células da crista neural. A fibronectina e a laminina encontram-se distribuídas no esclerótomo dos somitos anteriores e posteriores, logo, não influenciam qualquer preferência de células de crista neural pela metade anterior ou posterior do somito (Rickmann et al.,1985). Análises *in vitro* sugerem que estas moléculas podem servir como promotoras da migração de células da crista neural.

O colágeno IX, proteoglicano ligado ao condroitin sulfato encontra-se no esclerótomo dos somitos posteriores de embriões de aves nos estágios 17 a 23 durante o período de migração de células da crista neural. Células de crista neural evitaram substrato com colágeno IX *in vitro*, sugerindo que esta molécula pode agir como uma barreira a estas células e pode possuir um importante papel na migração segmentar das células de crista neural no tronco *in vivo* (Perris, Krotoski & Bronner-Fraser,1991). Outros proteoglicanos ligados ao condroitin sulfato podem estar envolvidos na orientação da migração das células de crista neural. Ligantes a PNA são encontrados nos somitos posteriores e não nos anteriores durante a migração de células da crista neural. Estudos *in vitro* sugerem que estes ligantes a PNA juntamente com outros fatores inibidores podem desempenhar um papel na migração *in vivo* de células da crista neural, agindo como barreira a estas células (Krull 2001). Grande parte destas moléculas inibidoras de células de crista neural, são também moléculas de matriz extracelular de cartilagem, encontradas na cartilagem embrionária do corpo vertebral de embriões de aves.

Segundo Althouse & Solursh (1986), os primeiros condroblastos começam a surgir a partir do estágio 23 a 25 HH, nas vértebras e nos brotos das asas, respectivamente. A notocorda serve como um substrato permissivo para sobrevivência, replicação e diferenciação das células do esclerótomo em condroblastos, uma vez que somitos isolados formam cartilagem espontaneamente na presença da notocorda. Entretanto, componentes da matriz extracelular cartilaginosa como keratan-sulfato, condroitin – sulfato e colágeno tipo II encontrados circundando a notocorda em estágios iniciais do desenvolvimento podem possuir outras funções como criar um ambiente favorável para sobrevivência e proliferação das células esclerotomais de linhagem condrogênica; ou ser um substrato no qual as células progenitoras podem adquirir e/ou manter sua arquitetura até a diferenciação. Por outro lado estas macromoléculas podem agir favorecendo a migração de células do esclerótomo para o espaço perinotocordal agindo como substâncias quimiotáticas. Estudos demonstram que a fibronectina possui ação anti-condrogênica, impedindo a diferenciação de condrócitos; quando células pré-condrogênicas do broto da asa de embriões de aves nos estágio 23 e 24 HH foram cultivadas em meio contendo fibronectina, estas células tornaram-se mesenquimais e não diferenciaram-se em condrócitos (Solursh et al.,1990).

O maior componente da matriz extracelular de cartilagem é o colágeno tipo II, que constitui 60% do total de proteínas presentes. É uma molécula em tripla hélice com três polipeptídeos idênticos, a cadeia $\alpha 1$ (tipo II) (Sheffield and Upholt,1985) e é codificado pelo gene *col2a1*; a transcrição deste gene em células mesenquimais precede a diferenciação em condroblastos e é sinal evidente da condrogênese (von der Mark and von der Mark, 1977; Kravis and Upholt, 1985; Kosher et al., 1986; Swalla et al., 1988, Cheah et al., 1991; Ng et al., 1993). O colágeno tipo II é um importante mantenedor da integridade de estruturas cartilaginosas e mutações em seu gene podem originar condroplasias (revisado por Vikkula et al., 1994; Ritvaniemi et al., 1995). A expressão do gene *col2a1* em embriões de camundongo ocorre quando as células do esclerótomo estão se dispersando. É fortemente expressado no

mesenquima pré-condrogênico, como por exemplo, a pré-vertebra derivada da condensação de células do esclerótomo. Sugere-se que o gene *sox9* é um controlador da expressão do gene *col2a1* na diferenciação de células condrogênicas e que a transcrição de ambos os genes é mantida enquanto as células pré-condrogênicas diferenciam-se em condroblastos imaturos e proliferantes.

O colágeno tipo II acumula-se na região livre de células ao redor da notocorda, enquanto as células do esclerótomo estão se condensando, antes de diferenciarem-se em cartilagem. O pró-colágeno tipo II é expressado em 2 formas, pró-colágeno IIA e pró-colágeno IIB. O tipo IIA é sintetizado por células condroprogenitoras, é depositado na matriz extracelular e ainda retém o propeptídeo NH₂, porém o COOH é removido. O domínio fibrilar do procolágeno tipo II pode prover um substrato para as células mesenquimais enquanto o propeptídeo NH₂ pode localizar a proteína responsável pela condrogênese. O propeptídeo NH₂ pode ligar-se aos fatores de crescimento BMP-2 e TGF- α 1, conhecidos por induzirem a condrogênese *in vivo* (Wang et al.,1990). Estudos realizados com brotos dos membros superiores de embriões de aves detectaram através de hibridização *in situ* a presença de mRNA para o colágeno tipo II em estágios iniciais do desenvolvimento, a partir do estágio 16 HH. Até o estágio 25 HH, início da condrogênese, a quantidade de mRNA para o colágeno tipo II aumenta consideravelmente nos brotos dos membros superiores (Koopman et al., 1997).

O colágeno IX é outra molécula encontrada na matriz extracelular da cartilagem, sempre em co-existência com o colágeno II. O colágeno IX está aparentemente envolvido na organização da rede de fibras de colágeno II em cartilagens e também faz ligações entre suas moléculas a fim de organizar a pré-cartilagem, uma vez que 10% da cartilagem embrionária é composta por colágeno IX e somente 1% da cartilagem adulta possui esta molécula (Wu et al.,2003). Na cartilagem embrionária as células possuem as integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{11}\beta_1$ que são co-expressadas com o colágeno IX. A porção α_1 possui a capacidade de ligar-se a este colágeno, sugerindo que o colágeno tipo IX

pode agir como uma molécula de adesão celular entre as células cartilaginosas e entre as células e a matriz extracelular (Heino et al.,2004).

O colágeno IX é encontrado na matriz perinotocordal e no esclerótomo do somito posterior tendo sido localizado por imunocitoquímica através do uso do anticorpo 2B9. Este reconhece somente um epítipo da molécula ao qual se liga o condroitin sulfato, encontrado somente no colágeno IX, sendo muito mais eficiente que outros anticorpos que se ligam à proteína propriamente dita. Estudos sugerem que moléculas inibidoras presentes na notocorda, matriz perinotocordal e esclerótomo posterior podem ser responsáveis pela não invasão de células de crista neural e axônios motores e sensoriais (Davies et al.,1990; Oakley and Tosney,1991). Ensaios *in vitro* demonstraram que células de crista neural e axônios evitaram substratos com colágeno IX, sugerindo que esta molécula pode agir como uma barreira a estas células (Halfter, Hassel & Ring,1996).

Moléculas que podem impedir a migração de precursores de melanócitos para regiões ventrais são os açúcares ligantes a PNA (lectina de amendoim). O PNA liga-se às células do esclerótomo posterior durante a somitogênese (Stern et al.,1986; Oakley and Tosney,1991). Um estudo demonstra que o tratamento de somitos com açúcares ligantes a PNA *in vitro* retira a capacidade inibidora do somito e células de crista neural invadem o esclerótomo anterior e posterior, sugerindo que estas moléculas ligantes a PNA podem estar envolvidas na segmentação do sistema nervoso periférico *in vivo* (Krull,2001). Ligantes a PNA foram observados no esclerótomo do somito posterior durante a migração de células da crista neural, estes ligantes provavelmente agem como uma barreira impedindo a passagem das células de crista para o somito posterior (Tosney,1991). O PNA parece ser um marcador de células pré-condrogênicas em diferenciação, sendo observadas marcações co-localizadas em sítios de tecidos condrogênicos como a matriz perinotocordal e brotos da asa de embriões a partir do estágio 23 HH (Althouse & Solursh,1986).

Na galinha Sedosa japonesa, as células de linhagem melanocítica que migram pela via dorsolateral, invadem também a via ventral colonizando regiões ventrais com melanócitos. Precusores destes foram observados através de marcação com anticorpo específico, na região ventral, ao redor da aorta dorsal e no mesentério dorsal (Reedy et al.,1998). Isto não ocorre em embriões da raça White Leghorn. Nesta raça, na via de migração ventral são observadas moléculas inibidoras que parecem impedir a migração de precusores de melanócitos (Faraco et al.,2001). Ligantes a PNA foram observados na via ventral de aves da raça White Leghorn enquanto os precusores de melanócitos estão migrando. Já nas aves da raça Sedosa japonesa, estas moléculas ligantes a PNA foram observadas em pequena quantidade e distribuição irregular, sugerindo possibilidade de passagem livre para a invasão de regiões ventrais pelos precusores de melanócitos (Freitas et al.,2003). Embriões de Sedosa japonesa e Leghorn no estágio 26 e 28 apresentam diferenças morfológicas entre seus somitos anteriores: as células que ocupam a via ventral, mais precisamente o espaço entre o gânglio e o somito, no embrião da raça Leghorn apresentam-se mais compactadas em relação às células que ocupam o mesmo espaço no embrião da raça Sedosa japonesa. Estas células possuem a mesma morfologia das células do esclerótomo que estão localizadas ao redor da notocorda e irão dar origem à cartilagem que mais tardiamente formará as vértebras (Portella,2002). A marcação com PNA observada por Freitas e colaboradores coincide com a área ocupada por estas células que são observadas colonizando a via ventral, parecendo impedir a passagem de precusores de melanócitos ventralmente.

A matriz extracelular da cartilagem é rica em proteoglicanos como o aggrecan que impede a migração de células de crista neural conforme descrito por Perris (2000). A deposição de aggrecan é considerada uma característica da condrogênese. Outros proteoglicanos como decorin, biglycan e perlecan também são encontrados na matriz extracelular da cartilagem. Antes do processo de condrogênese ocorrer, as células são circundadas por uma matriz extracelular com predominância de ácido hialurônico. Esta

molécula é então degradada pelas células através da enzima hialuronidase e, os resíduos do ácido hialurônico são utilizados para fazer ligações entre as células. Se as interações ácido hialurônico-célula forem rompidas *in vitro*, resultam na expressão de receptores de superfície para o PNA, no mesênquima do broto da asa em embriões de aves. O aggrecan possui um centro protéico com um domínio de ligação para o açúcar queratan sulfato e outro para o açúcar condroitin sulfato. O colágeno tipo II representa 60% do colágeno total da matriz extracelular da cartilagem, enquanto o colágeno tipo IX representa 10% do colágeno da matriz extracelular de cartilagem embrionária e somente 1-2% do colágeno total da cartilagem de um adulto (Knudson,2001). Conforme as observações de Bronner-Fraser (1991) os colágenos tipo II e IX impedem a migração de células da crista neural.

Estes dados podem nos levar a levantar a hipótese de que na ave da raça White Leghorn, a organização do esclerótomo com deposição precoce de matriz extracelular de cartilagem pode originar componentes que impeçam a migração de precursores de melanócitos para regiões ventrais. Em aves da raça Sedosa estes componentes seriam depositados mais tardiamente, quando as células de linhagem melanocítica já teriam percorrido a via ventral de migração. Já que as moléculas de matriz extracelular foram descritas como tendo um papel promotor, direcionador ou inibidor da migração de células de crista neural, é importante saber como estas moléculas estão arranjadas e organizadas espaço/temporalmente nos caminhos de migração de embriões das diferentes raças, e qual a interação entre as células da crista neural e estas moléculas, buscando entender um possível papel dos componentes da matriz-extracelular no direcionamento de migração das células de crista neural.

2. OBJETIVOS

Identificar a presença de moléculas de matriz extracelular da cartilagem nas vias ventrais de migração evitadas pelas células de crista neural de linhagem melanocítica em embriões de aves da raça Leghorn.

Verificar a presença ou a ausência destas moléculas na via ventral, alternativamente utilizada por células de linhagem melanocítica em embriões de aves da raça Sedosa japonesa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Obtenção dos ovos

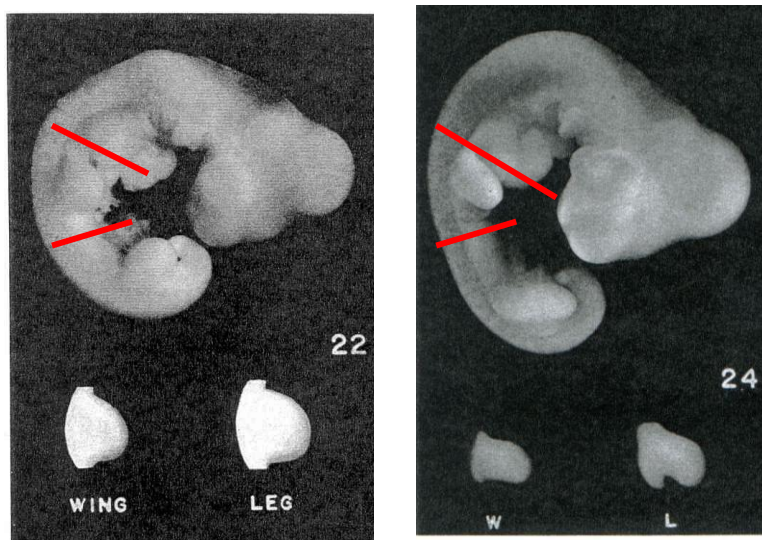
Ovos embrionados de galinhas Sedosa Japonesa e White Leghorn fornecidos pelo aviário da Universidade Federal do Paraná, previamente limpos, foram incubados a 38° C até atingirem os estágios 22, 24, 26 e 28 do desenvolvimento (Hamburger & Hamilton, 1951) que correspondem respectivamente a 3 ½, 4, 4 ½ e 5 ½ dias de incubação.

3.2) Obtenção dos embriões

Os embriões nos estágios 22, 24, 26, e 28 foram retirados dos ovos e colocados em placa de Petri com salina tamponada com fosfato (PBS). Sob microscópio estereoscópico suas membranas foram retiradas e o topo de sua cabeça e cauda seccionados, com auxílio de pinças e bisturi.

3.3) Inclusão em Paraplast

Embriões foram fixados em Metacan (metanol, ácido acético e formoldeído) por três horas, lavados em PBS e a região do tronco na altura do broto da asa, compreendendo somitos foi recortada (sinalizada em vermelho na figura abaixo). Os segmentos foram desidratados e incluídos em Paraplast.



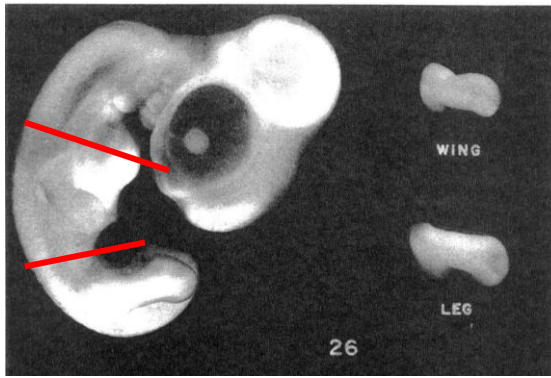
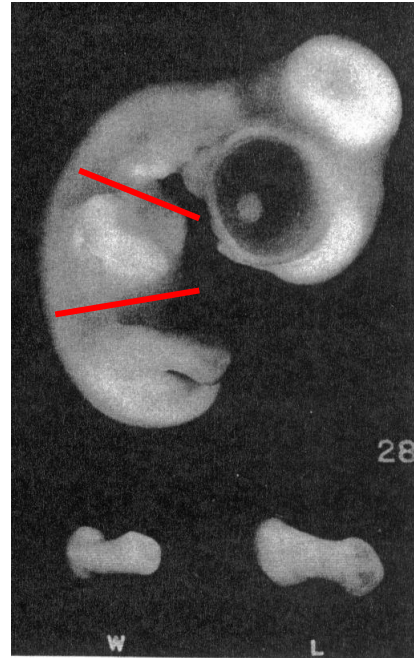


ILUSTRAÇÃO nº 7

Estágios do desenvolvimento do embrião de ave.
(Fonte: WOLPERT et al., 2000)



3.4) Microtomia para Paraplast

Cortes de 5µm foram obtidos, pela secção em micrótomo, da região do tronco dos embriões incluídos em Paraplast. Os cortes foram coletados em lâminas previamente recobertas por solução de gelatina.

3.5) Inclusão em gelatina

Embriões foram fixados em paraformaldeído 4% por duas horas a 4°C, lavados em PBS, e tiveram a região do tronco recortada e estocada em solução de sacarose 5% durante duas horas a 4°C. As regiões do tronco ficaram durante a noite em uma solução de sacarose 15% a 4°C e foram incluídas em gelatina 7,5% em PBS/sacarose 15%. Os troncos foram colocados em formas para congelação e congelados em nitrogênio líquido. Os blocos obtidos foram estocados em freezer a -20°C.

3.6) Criomicrotomia

Cortes de 8µm obtidos pela secção, em criostato a -20°C, do tronco dos embriões incluídos em gelatina, foram coletados em lâminas previamente recobertas por solução de gelatina. As lâminas obtidas foram estocadas em freezer a -20°C.

3.7) Coloração hematoxilina - eosina

Cortes obtidos dos embriões incluídos em Paraplast foram desparafinizados, hidratados em uma série decrescente de etanol, e lavados em água destilada. Foram então corados com hematoxilina-eosina, desidratados e montados com Permount.

3.8) Citoquímica para detecção de ácido hialurônico

Cortes obtidos dos embriões incluídos em Paraplast foram desparafinizados, hidratados em uma série decrescente de etanol, e lavados em água destilada. Foram tratados com solução de hialuronidase 1% em tampão fosfato com pH 6,7 durante três horas a 37°C. Algumas lâminas foram utilizadas como controle, permanecendo o mesmo tempo e à mesma temperatura, tratadas somente com o tampão fosfato. Todas as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com alcian blue 1%, contra-coradas com vermelho neutro aquoso 0,5%, desidratadas e montadas com Permount

3.9) Imunocitoquímica para detecção de colágeno tipo II

Cortes obtidos dos embriões incluídos em Paraplast foram desparafinizados, hidratados em uma série decrescente de etanol, e lavados em água destilada. Foram tratados com solução de hialuronidase em tampão acetato de sódio com pH 5,2 com inibidores de protease durante uma hora a 37°C. Foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS e soroalbumina bovina (BSA) 0,1%. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específico para o colágeno tipo II (CIIC1 do Iowa Hybridoma Bank) a 4°C, em câmara úmida, durante a noite. Algumas lâminas foram utilizadas como controle, sendo incubadas somente com PBS. Após lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas no anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG da Chemicon conjugado a rodamina durante 1 hora e trinta minutos, lavadas em PBS e montadas com Gelmount.

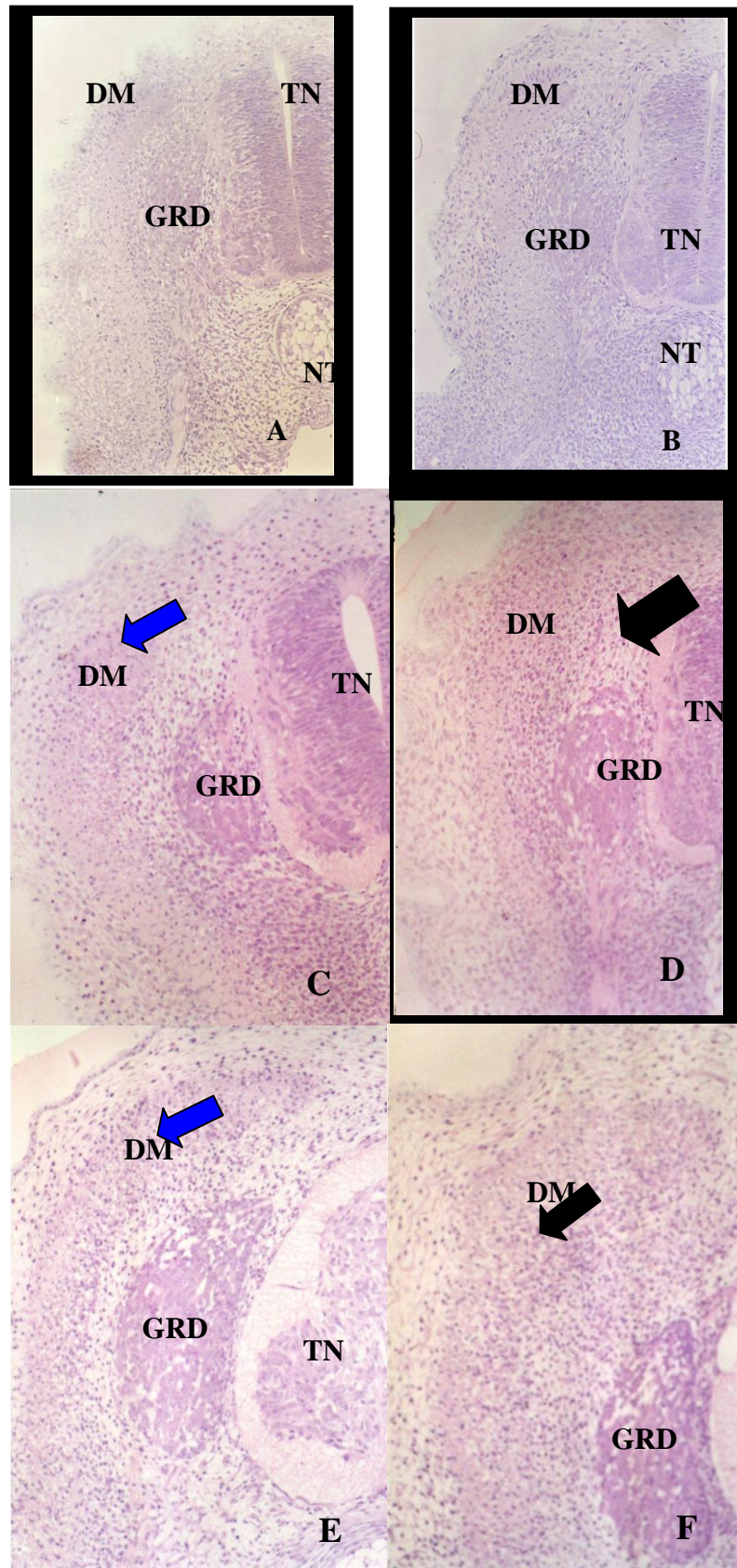
3.10) Imunocitoquímica para detecção de condroitin sulfato, colágeno tipo IX e fibronectina

Os cortes obtidos em criostato foram deixados a temperatura ambiente por quinze minutos, lavados em PBS, PBS/glicina 0,1M e submetidos ao bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS e soroalbumina bovina (BSA) 0,1%. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específico (para condroitin sulfato da Sigma, colágeno tipo IX / 2B9 e fibronectina / B3D6, Iowa Hybridoma Bank) a 4°C, em câmara úmida, durante a noite. Algumas lâminas foram utilizadas como controle, sendo incubadas somente com PBS. Após lavagens em PBS, as lâminas incubadas com o anticorpo primário para o condroitin sulfato foram incubadas no anticorpo secundário Goat anti-mouse IgM da Chemicon, e as lâminas incubadas com os anticorpos primários para colágeno IX e fibronectina foram incubadas no anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG da Chemicon conjugado a rodamina, durante 1 hora e trinta minutos, lavadas em PBS e montadas com Gelmount.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 MORFOLOGIA DO TRONCO DE EMBRIÕES DA AVE DAS RAÇAS WHITE LEGHORN E SEDOSA JAPONESA

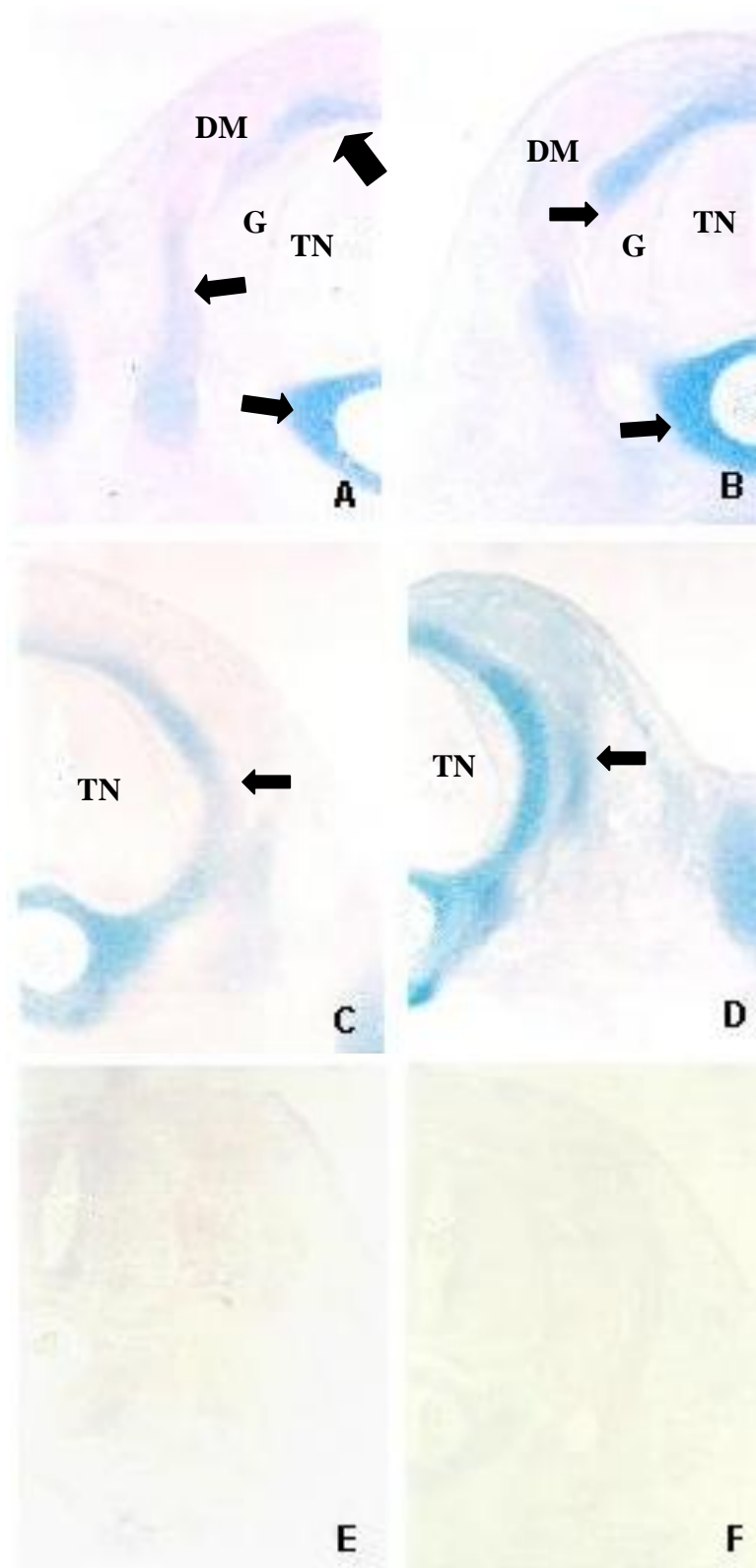
Embriões das raças Sedosa Japonesa e White Leghorn apresentam diferenças nas moléculas que estão presentes nas vias de migração das células de crista neural e como consequência do caráter inibidor destas moléculas, as células de crista neural precursoras de melanócitos invadem regiões ventrais em embriões da raça Sedosa Japonesa, o que não ocorre em embriões da raça White Leghorn. A morfologia destas vias de migração analisada em embriões de ambas as raças para os estágios 22, 24, 26 e 28 HH. Os embriões da raça Sedosa japonesa branca e da raça White Leghorn demonstraram diferenças na distribuição de células do esclerótomo na região do tronco nos estágios 26 e 28 do desenvolvimento. As células localizadas entre o dermátomo do somito anterior e o tubo neural, ou seja na via ventral, encontram-se mais dispersas nos embriões da raça Sedosa japonesa (Fotografia 1B e 1D) do que em embriões da raça White Leghorn (Fotografia 1E e 1F), onde as células da mesma região aparentam estar mais compactadas.



Fotografia1 – (A e B) Somito anterior de embriões das raças SJ (A) e WL (B) no estágio 24 do desenvolvimento, não há diferenças morfológicas visíveis. (C e D) Somito anterior de embriões das raças SJ (A) e WL (B) no estágio 26. (E e F) Somito anterior de embriões das raças SJ (E) e WL (F) no estágio 28. As setas azuis em C e E indicam a via ventral com células mais dispersas em embriões da raça SJ nos estágios 26 e 28 respectivamente. As setas pretas em D e F indicam a via ventral com células mais compactadas em embriões da raça WL nos estágios 26 e 28 respectivamente. DM = dermatômo; GRD = gânglio de raiz dorsal e TN = tubo neural. Aumento 100 X. 34

4.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO HIALURÔNICO NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN

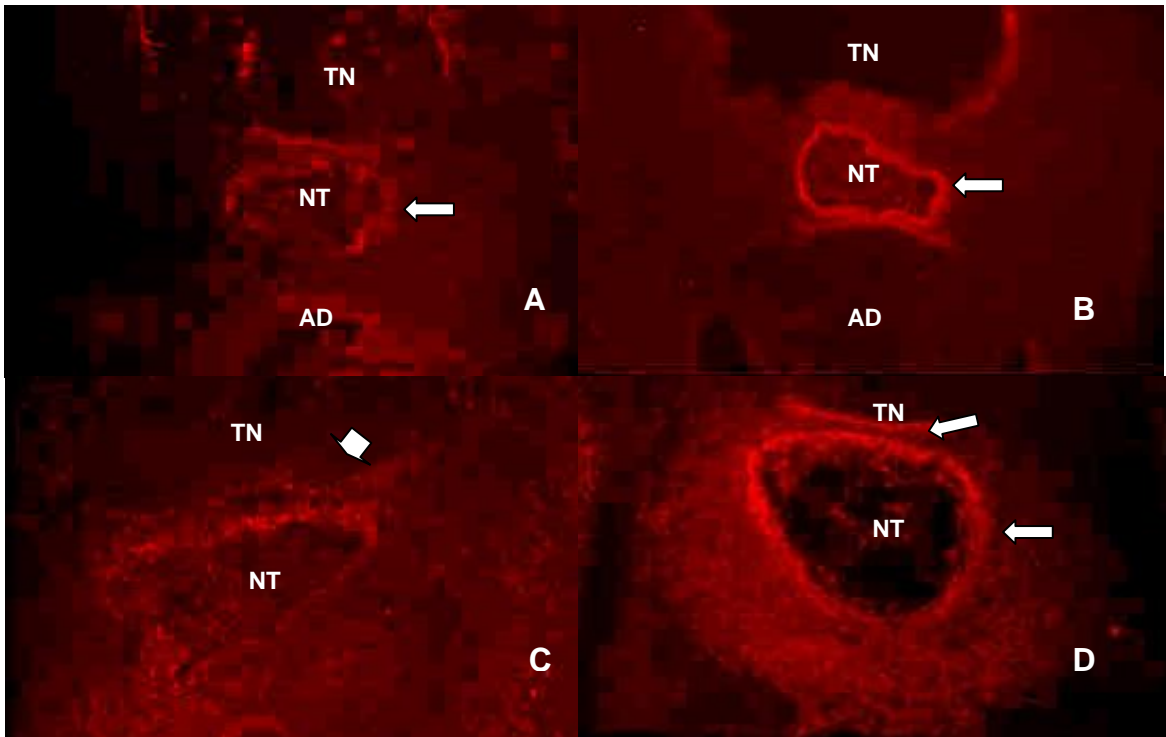
Embriões da raça Sedosa Japonesa e da raça White Leghorn apresentam diferenças para a distribuição do ácido hialurônico na região do tronco de todos os estágios do desenvolvimento estudados. Porém, os resultados foram mais visíveis nos estágios 26 e 28. O ácido hialurônico parece estar em maior quantidade em embriões da raça White Leghorn e co-localizado com as células compactadas vistas na análise morfológica, na via ventral, muito evidente ao redor da notocorda e no início da via ventral no somito anterior (Fotografia 2B). No somito posterior, embriões da raça Leghorn apresentam uma faixa contínua de ácido hialurônico (Fotografia 2D). A molécula também está presente em embriões da raça Sedosa japonesa (Fotografia 2A e 2B), porém não de modo tão evidente como nos embriões de White Leghorn. Os cortes controle não apresentaram coloração com o alcian blue. A presença de ácido hialurônico sugerida pela coloração com alcian blue, foi testada pela digestão dos cortes com hialuronidase que resultam em ausência de reação ao corante.



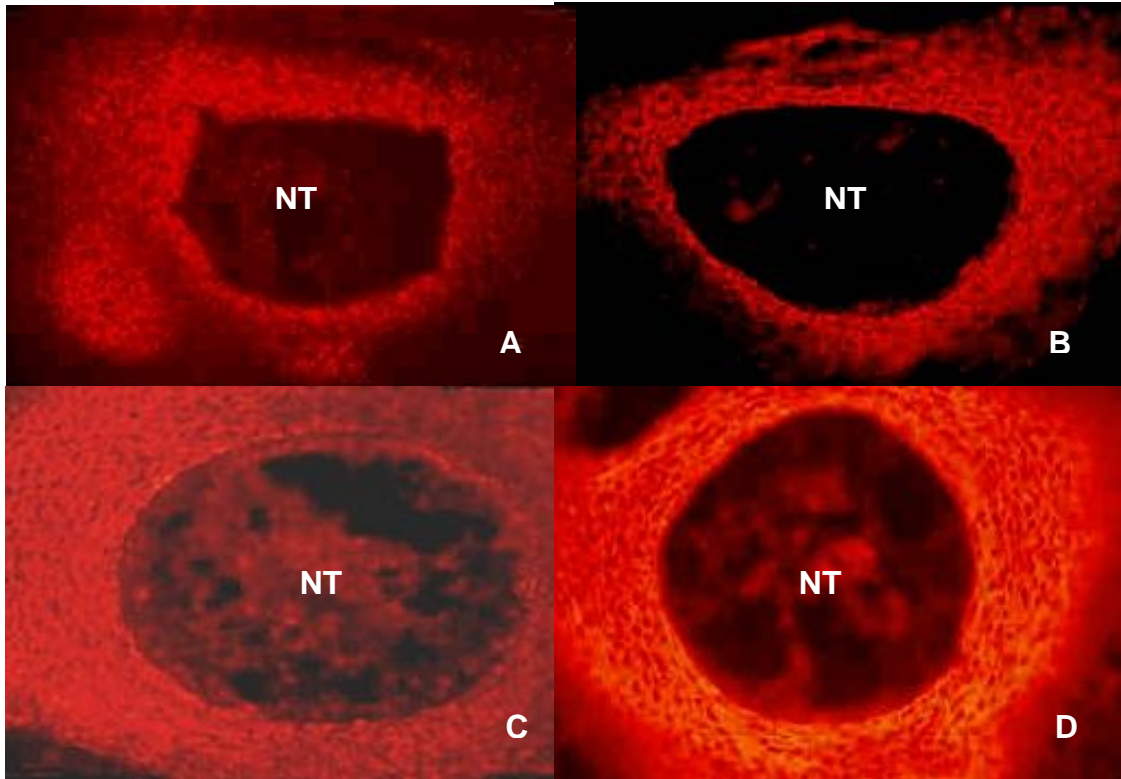
Fotografia 2 – (A e B) Somito anterior de embriões das raças Sedosa japonesa (A) e White Leghorn (B) no estágio 26 do desenvolvimento. (C e D) Somito posterior de embriões das raças Sedosa japonesa (C) e White Leghorn (D) no estágio 26 do desenvolvimento. As setas pretas em B e D indicam a localização do ácido hialurônico em embriões da raça White Leghorn no estágio 26, no somito anterior e posterior respectivamente. (E e F) Controle das Sedosa Japonesa (E) e White Leghorn (F), ausência de coloração pelo alcian blue. DM = dermatomo; G = gânglio de raiz dorsal e TN = tubo neural. Aumento 100X.

4.3 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CONDROITIN SULFATO NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN

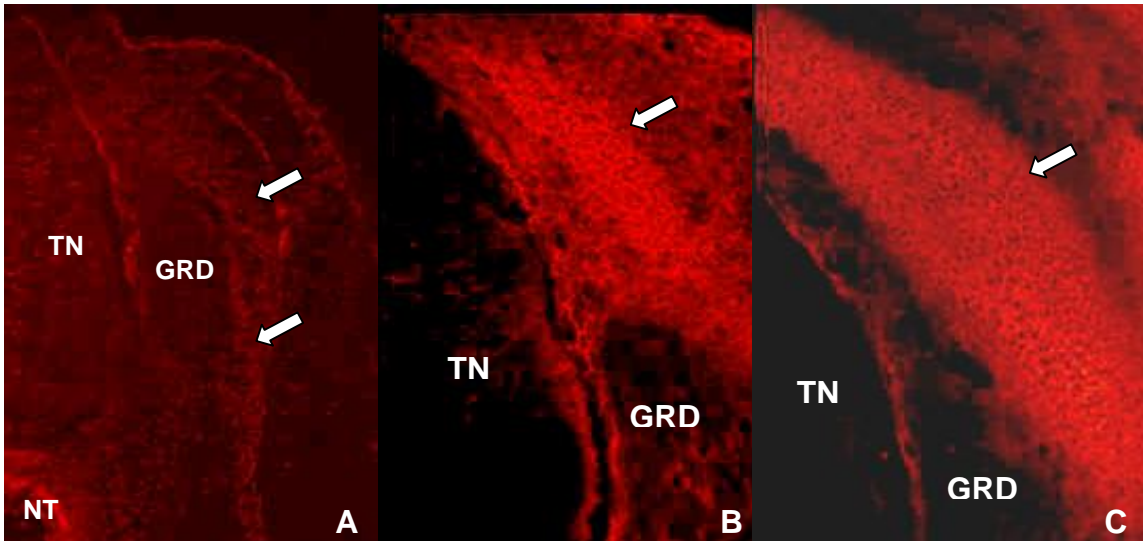
A presença de condroitin sulfato foi detectada no tronco de embriões de ave no espaço perinotocordal em todos os estágios tanto para a raça White Leghorn, quanto para a raça Sedosa japonesa (Fotografias 3A-D; 4A-D). A raça White Leghorn apresentou maior quantidade de condroitin sulfato quando comparada à raça Sedosa japonesa em todos os estágios. A quantidade de condroitin sulfato no espaço perinotocordal aumentou gradativamente com o desenvolvimento do embrião, do estágio 22 para o estágio 28 (comparar fotografias 3 e 4). A raça White Leghorn apresentou marcações positivas para a presença de condroitin sulfato também na via ventral, a partir do estágio 24 do desenvolvimento (Fotografia 5A-C). Marcações nas vias de migração de células da crista neural não foram observadas em embriões da raça Sedosa japonesa. O espaço logo acima do tubo neural apresentou marcações para os estágios 26 e 28 da raça White Leghorn (Fotografia 6).



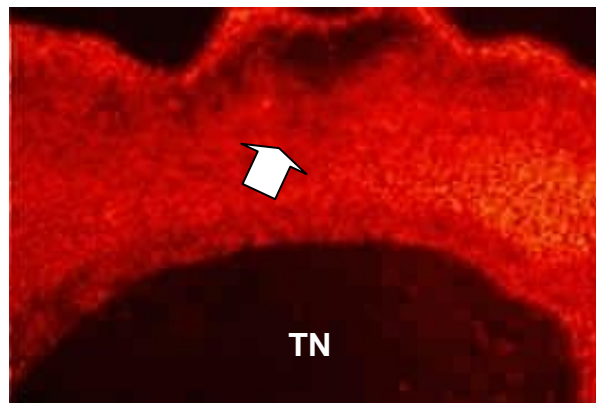
Fotografia 3 – (A) Embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 22 do desenvolvimento. A seta branca indica a marcação do condroitin sulfato no espaço perinotocordal. (B) Embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 22 do desenvolvimento. A seta branca indica a marcação no espaço perinotocordal, notar a marcação mais intensa se comparada á do embrião da raça Sedosa japonesa em (A). (C) Embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 24 do desenvolvimento. A seta indica marcação do condroitin sulfato no espaço perinotocordal. (D) Embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 24 do desenvolvimento. A seta indica a marcação do condroitin sulfato no espaço perinotocordal, mais intensa que nos embrião da raça Sedosa japonesa no mesmo estágio do desenvolvimento. AD = aorta dorsal; NT = notocorda e TN = tubo neural Aumento 200X



Fotografia 4 – (A) Notocorda de embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 26 do desenvolvimento. Notar marcação para o condroitin sulfato ao redor. (B) Notocorda de embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 26 do desenvolvimento. Notar marcação mais intensa ao redor que na notocorda do embrião de Sedosa japonesa no mesmo estágio. (C) Notocorda de embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 28 do desenvolvimento. Notar marcação para o condroitin sulfato ao redor. (D) Notocorda de embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 28 do desenvolvimento. Notar marcação mais intensa ao redor que na notocorda do embrião de Sedosa japonesa no mesmo estágio. NT = notocorda Aumento 200X.



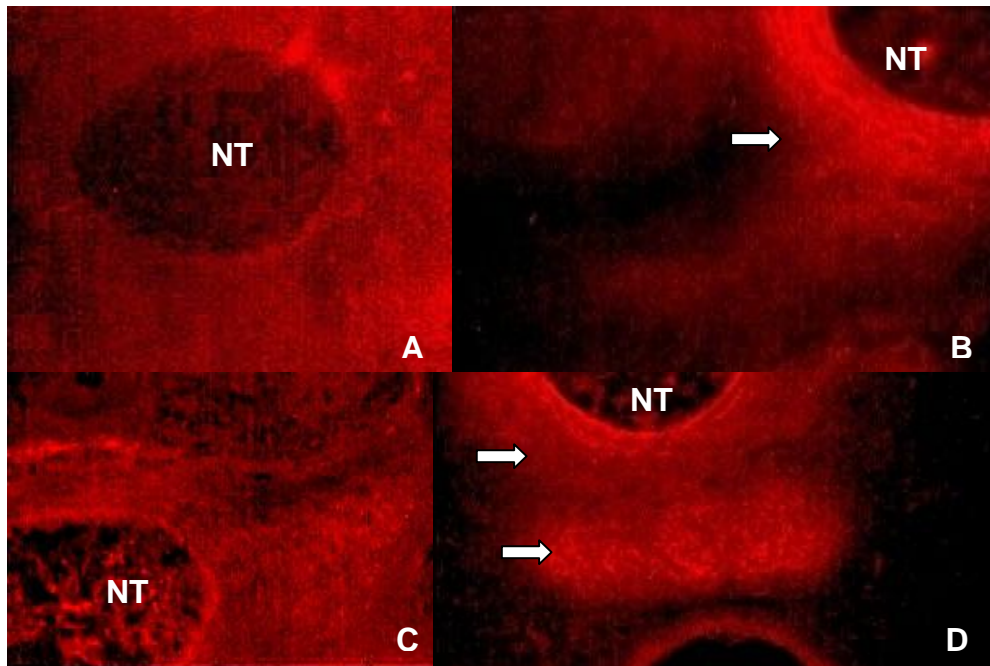
Fotografia 5 – Embriões de ave da raça White Leghorn nos estágio 24 (A), 26 (B) e 28 (C) do desenvolvimento. As setas indicam a marcação do condroitin sulfato na via ventral no somito anterior. Aumento 200X.



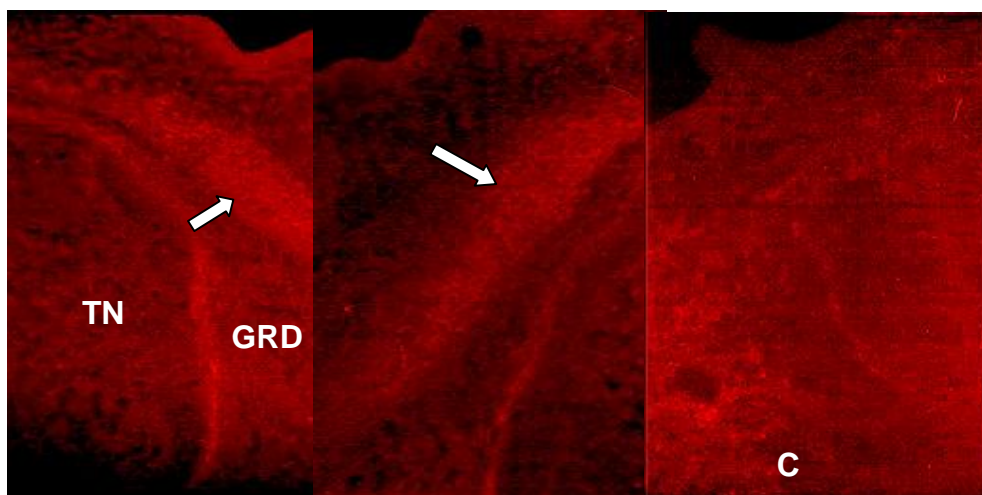
Fotografia 6 – Embrião da raça White Leghorn no estágio 28 do desenvolvimento. A seta indica a marcação para condroitin sulfato acima do tubo neural. Aumento 200X.

4.4 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO IX NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN

O colágeno IX apresentou diferenças na distribuição no tronco de embriões das raças Sedosa japonesa e White Leghorn. Na raça White Leghorn, embriões nos estágios 26 e 28 apresentaram grande quantidade de colágeno IX no espaço perinotocordal (Fotografia 7B e D), na região dorsal ao tubo neural e na via ventral (Fotografia 8A) quando comparados com embriões da raça Sedosa japonesa nos mesmos estágios (Fotografias 7A e C; 8B). Em embriões de Sedosa o colágeno IX parece ter sua expressão iniciada mais tardiamente, pois somente no estágio 28 observa-se marcação mais evidente nas regiões em que este colágeno aparece em White Leghorn, já em estágios mais iniciais.



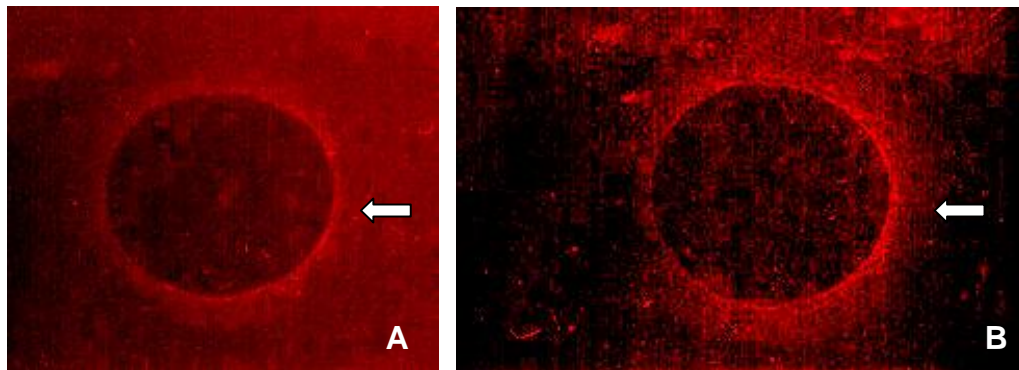
Fotografia 7 – Expressão de colágeno IX (A) Embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 26 do desenvolvimento. Notar pouca marcação ao redor da notocorda. (B) Embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 26 do desenvolvimento. Notar marcação intensa no espaço perinotocordal. (C) Embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 28 do desenvolvimento. Notar marcação ao redor da notocorda. (D) Embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 28 do desenvolvimento. Notar marcação intensa no espaço perinotocordal, mais espalhada que no estágio 26 da mesma raça. NT = notocorda. Aumentos 200X.



Fotografia 8 – Expressão de colágeno IX (A) Embrião de ave da raça White Leghorn no estágio 28 do desenvolvimento. A seta indica marcação na via ventral. (B) Embrião de ave da raça Sedosa japonesa no estágio 28 do desenvolvimento. A seta indica marcação na via ventral. (C) Controle. TN = tubo neural; GRD = gânglio de raiz dorsal. Aumentos 200X.

4.5 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO II NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN

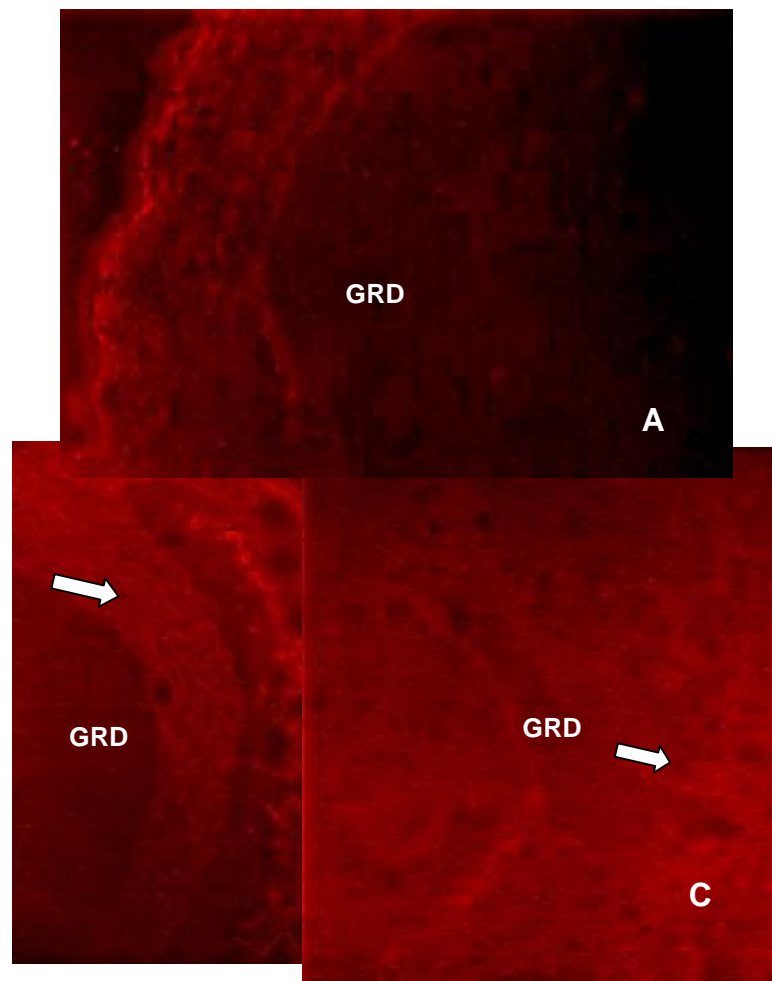
A distribuição do colágeno II foi semelhante a do colágeno IX para o espaço perinotocordal. Porém, o colágeno II não foi detectado no espaço perinotocordal de embriões de ave da raça Sedosa japonesa nos estágios analisados. Nos embriões de ave da raça White Leghorn nos estágios 26 e 28 do desenvolvimento, foi observada a presença de colágeno II no espaço perinotocordal, próximo à lâmina basal da notocorda.



Fotografia 9 – Embriões de ave da raça White Leghorn nos estágios 26 (A) e 28 (B) do desenvolvimento em aumento de 200X. As setas indicam a marcação do colágeno II no espaço perinotocordal, próximo a lâmina basal da notocorda.

4.6 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO II NO TRONCO DE EMBRIÕES DE AVES DAS RAÇAS SEDOSA JAPONESA E WHITE LEGHORN

A distribuição da fibronectina demonstrou diferenças entre os embriões de ave das raças White Leghorn e Sedosa japonesa nos estágios 26 e 28 do desenvolvimento. Na raça White Leghorn, a marcação para fibronectina ocorre somente na via dorsolateral de migração de células da crista neural. Já na raça Sedosa japonesa, a marcação para fibronectina aparece em ambas as vias de migração, dorsolateral e ventral



Fotografia 10 – Fibronectina (A) Somito de embrião de ave da raça White Leghorn em aumento de 200X. Notar ausência de marcação na via ventral e marcação somente na dorsolateral. Somito de embrião de ave da raça Sedosa japonesa (B) aum. 200X e (C) 400X. As setas indicam a marcação da fibronectina na via ventral. GRD = gânglio de raiz dorsal

Os resultados encontrados encontram-se resumidos na tabela abaixo:

Molécula de matriz	Região perinotocordal WL	Região perinotocordal SB	Via ventral WL	Via ventral SB
Ácido hialurônico	++++	+	++++	+
Colágeno II	+	-	-	-
Colágeno IX	++++	+	++++	+
Fibronectina	-	-	-	+
Condroitin sulfato	++++	+	+	-

4. DISCUSSÃO

Embriões da raça White Leghorn apresentaram várias diferenças se comparados com embriões da raça Sedosa Japonesa quando analisamos a presença e distribuição de moléculas como ácido hialurônico, condroitin sulfato, colágeno IX, colágeno II e fibronectina. O ácido hialurônico está presente em regiões que são evitadas pelas células de crista neural enquanto estas estão migrando, como espaço perinotocordal e somito posterior. O ácido hialurônico é uma molécula encontrada na matriz extracelular de cartilagem que predomina antes da diferenciação dos condrócitos (Perris, 2000). Embriões de ambas as raças apresentam ácido hialurônico em regiões em que haverá condrogênese, como por exemplo, o espaço perinotocordal. A marcação para o ácido hialurônico em regiões que futuramente serão cartilagem é muito mais evidente em embriões da raça White Leghorn. Como as moléculas são quebradas quando do estabelecimento da matriz cartilaginosa (Knudson, 2001), a presença de ácido hialurônico nos estágios observados, indica que ainda estão se ocupando a região os elementos de pré-cartilagem.

Proteoglicanos ricos em condroitin sulfato são moléculas de caráter inibidor á migração de células da crista neural (Perris, 1991). O colágeno IX é um proteoglicano rico em condroitin sulfato que também age como molécula inibidora á migração de células de crista neural (Oakley & Tosney, 1991), e compõe 10% da matriz extracelular da cartilagem embrionária (Wu et al., 2003). Embriões das raças White Leghorn e Sedosa Japonesa mostraram marcações positivas: tanto para colágeno IX como para condroitin sulfato. Embriões da raça White Leghorn possuem condroitin sulfato em todos os estágios analisados no espaço perinotocordal, na via ventral nos estágios 24, 26 e 28 HH e logo acima do tubo neural nos estágios 26 e 28 HH. Estas marcações aumentaram gradativamente com a progressão do desenvolvimento do embrião e foram muito mais evidentes em embriões da raça White Leghorn do que em embriões da raça Sedosa Japonesa. Como o

anticorpo para colágeno IX utilizado reconhece especificamente a ligação do condroitin sulfato na molécula (Davies *et al.*, 1990; Oakley and Tosney, 1991), as duas marcações utilizadas comprovam a presença deste, apontando para a identificação deste açúcar sulfatado, como componente de colágeno de matriz extracelular. As marcações para o colágeno IX estão co-localizadas com as marcações para o condroitin sulfato, porém de maneira menos intensa. Embriões de ambas as raças com marcações positivas para o colágeno IX apresentam o mesmo padrão de marcações cada vez mais intensas conforme o desenvolvimento do embrião, que embriões positivos ao condroitin sulfato. Da mesma forma que os embriões positivos para o condroitin sulfato, as marcações positivas para o colágeno IX em embriões da raça White Leghorn são muito mais evidentes que em embriões da raça Sedosa Japonesa.

O colágeno II que representa 60% da matriz extracelular da cartilagem e, interage com o colágeno IX para a organização da pré-cartilagem (Wu *et al.*, 2003) encontra-se somente no espaço perinotocordal de embriões da raça White Leghorn nos estágios 26 e 28 HH. Não há marcações em outras regiões do tronco de embriões da raça White Leghorn e em troncos de embriões da raça Sedosa Japonesa. Esta distribuição está de acordo com a expressão temporal do colágeno II que ocorre após a deposição de colágeno IX, sendo este o organizador do arranjo adotado e necessariamente devendo ter sua expressão ocorrendo previamente (Wu *et al.*, 2003). Nos estágios analisados, mesmo no mais tardio (st28), a deposição de colágeno II está apenas iniciando, sendo sua presença evidente somente entre as células da notocorda e imediatamente ao redor desta. Com o desenvolvimento e expansão das células do esclerótomo, em estágios ulteriores, provavelmente a expressão de colágeno II se estenderá às áreas ocupadas por colágeno IX nos estágios analisados. Sugere-se que o colágeno II esteja envolvido na condrogênese, servindo de elemento de ligação para citocinas e fatores de crescimento (Zhu *et al.*, 1999). Nos estágios aqui analisados, a agregação de pré-cartilagem já é morfológicamente evidente, mas não se observa

diferenciação que deve estar na dependência de ação de fatores que podem precisar da colaboração do colágeno II para efetivamente atuarem.

A fibronectina encontra-se distribuída nos somitos anteriores e posteriores, não influenciando qualquer preferência de células de crista neural (Rickmann et al, 1985) e provavelmente age como molécula promotora para migração destas células. Por outro lado, a fibronectina é um agente inibidor da condrogênese (Solursh et al., 1990). Embriões de ave das raças White Leghorn e Sedosa Japonesa demonstraram diferenças significativas na distribuição da fibronectina no tronco. Embriões da raça Leghorn nos estágios 24, 26 e 28 HH possuem fibronectina somente na via dorsolateral de migração das células da crista neural. Já os embriões da raça Sedosa Japonesa possuem fibronectina nas duas vias, dorsolateral e ventral. A presença de fibronectina na via ventral em embriões de Sedosa Japonesa pode estar envolvida com o atraso no estabelecimento de pré-cartilagem nestes embriões, sugerido pela fraca expressão de moléculas como ácido hialurônico, condroitin sulfato e colágeno IX, observada neste trabalho. A distribuição de fibronectina nas vias dorsolateral e ventral corresponde àquela descrita para ephrinas (manuscrito em preparação) nestes estágios de desenvolvimento. Ephrinas são proteínas para as quais se reporta papel inibitório em relação a células de linhagem neuronal (Krull et al, 1997; Santiago e Erickson, 2002). Sobre células de linhagem melanocítica as ephrinas têm ação estimuladora, parecendo aumentar a ligação das células à fibronectina que serve de substrato para a migração (Santiago e Erickson, 2002). A presença de fibronectina na via dorsolateral em embriões de White Leghorn e Sedosa e na via ventral de Sedosa deve estar relacionada com a migração de melanoblastos que ocorre a partir do estágio 20 e que só em Sedosa é observada na via ventral. Em embriões de White Leghorn, portanto, a ausência de fibronectina e de ephrinas, se por um lado impede a passagem de melanoblastos, por outro, permite o início de estabelecimento dos componentes de cartilagem. Como moléculas componentes da matriz extracelular da cartilagem como condroitin sulfato e colágeno IX também

possuem caráter inibidor e estão co-localizadas em locais evitados pelas células de crista neural que estão migrando, sugere-se que a matriz extracelular da precartilagem esteja interferindo na migração das células da crista neural. Embriões da raça White Leghorn possuem maior quantidade de colágeno IX e de condroitin sulfato que embriões da raça Sedosa Japonesa na região onde se formará a vértebra, sugerindo que a formação da vértebra acontece antes em embriões da raça White Leghorn. A marcação positiva para o colágeno II no espaço perinotocordal de embriões da raça White Leghorn nos estágios 26 e 28 confirma que a matriz extracelular de cartilagem já está se depositando e formando as vértebras em embriões desta raça. A marcação positiva para o colágeno II por sua vez, não ocorre em embriões da raça Sedosa Japonesa, sugerindo que a deposição da matriz extracelular de cartilagem e a diferenciação dos condrócitos acontece mais tardiamente nesta raça que na raça White Leghorn. Ligantes a PNA encontram-se na via ventral de embriões da raça White Leghorn enquanto células de crista neural estão migrando, já em embriões da raça Sedosa Japonesa ligantes a PNA não foram observados nesta via, sugerindo que estas moléculas podem agir como inibidores de migração de células da crista neural (Freitas et al, 2003). O PNA por sua vez, parece ser um marcador de células pré-condrogênicas em diferenciação (Althouse & Solursh, 1986), também confirmando a diferenciação da cartilagem anteriormente em embriões da raça White Leghorn. Segundo estes dados, a formação da vértebra ocorre antes em embriões da raça White Leghorn que em embriões da raça Sedosa Japonesa e, a matriz extracelular da precartilagem que forma a vértebra possui componentes que impedem a migração de células da crista neural.

5. CONCLUSÃO

Estes dados nos levam a crer que os componentes envolvidos na formação da cartilagem da vértebra iniciam sua expressão em embriões da raça White Leghorn alguns estágios antes do que em embriões da raça Sedosa Japonesa, na região em que se localizam as células do esclerótomo que colonizam o espaço perinotocordal. A matriz extracelular componente da precartilagem apresenta moléculas como colágeno IX, condroitin sulfato e ácido hialurônico, que agem como barreira para as células da crista neural, não permitindo a colonização de regiões ventrais por precursores de melanócitos nos embriões da raça White Leghorn. Em embriões da raça Sedosa Japonesa a expressão destas moléculas ocorre mais tardiamente deixando livres vias migratórias através das quais precursores de melanócitos invadem regiões ventrais, colonizando órgãos e membranas viscerais. A diferenciação total da cartilagem ocorre posteriormente aos estágios 26-28 aqui analisados, como se pode inferir pelo pouco grau de expressão de colágeno II observado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRIST, B.; SCHMIDT, C.; HUANG, R.; WILTING, J.; BRAND-SABERI, B. Segmentation of the vertebrate body. **Anat Embryol**, New York, v 197, p.1 –8, 1998.

YAMAGUCHI, TP.; HARPAL, K.; HENKEMEYER, M.; ROSSANT, J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. **Genes Dev**, Great Britain, U. K. v. 8, p. 3032 – 3044, 1994.

CHRIST, B.; ORDAHL, CP. Early stages of chick somite development. **Anat Embryol**, New York, v. 191 p. 381 – 396, 1995.

PALMEIRIM, I.; HENRIQUE, D.; ISH-HOROWICZ, D.; POURQUIÉ, O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. **Cell**, Academic Press U. S. A., v. 91, p. 639 – 648, 1997.

BURGESS, R.; RAWLS, A.; BROWN, D.; BRADLEY, A.; OLSON, EN. Requirement of the *paraxis* gene for somite formation and musculoskeletal patterning. **Nature**, New York, v. 384, p. 570 – 573, 1996.

MÜLLER, TS.; EBENSPERGER, C.; NEUBÜSER, A.; KOSEKI, H.; BALLING, R.; CHRIST, B.; WILTING, J. Expression of avian *Pax-1* and *Pax-9* in the sclerotomes is controlled by axial and lateral tissues, but intrinsically regulated in pharyngeal endoderm. **Dev Biol**, Academic Press U. S. A., v. 178, p.403 – 417, 1996.

MCMAHON, JA.; TAKADA, S.; ZIMMERMAN, LB.; FAN, CM.; HARLAND, RM.; MCMAHON, AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. **Genes Dev**, Great Britain, U. K. v. 12, p.1438 –1452, 1998.

KRULL, CE. Segmental organization of neural crest migration. **Mechanisms of Development**, Great Britain, U. K., v. 105, p. 37 – 45, 2001.

BRONNER-FRASER, M.; KROTOSKI, D.; PERRIS, R. Collagens in avian neural crest development: distribution *in vivo* and migration-promoting ability *in vitro*. **Development**. Great Britain, U. K., v. 113, p. 969 – 984, 1991.

CARLSON, B. M. **Foundations of embryology**. 6. ed. New York: McGraw Hill, 1996.

ERICKSON, C. A.; DEHNBOSTEL D. B.; TOSNEY W. K. Neural Crest Cells Prefer Myotome's Basal Lamina over the Sclerotome as a Substratum. **Dev. Biol.**, Academic Press U. S. A., v. 163, p. 389 – 406, 1994.

FARACO, C. D.; VAZ, S. A .; PÁSTOR, M. V.; ERICKSON, C. A . Hyperpigmentation in the Silkie Fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. **Dev. Dyn.**, New York, v. 220, p. 212 – 225, 2001.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in development of the chick embryo. **J. Morphol.**, New York, v. 88, p. 49-92, 1951.

KASTNER, V.; SCHEEL, M.; NEWGREEN, D. F. Morphogenesis of sclerotome and neural crest in avian embryos. In vivo and in vitro studies on the role of notocordal extracelular material. **Cell Tissue Res.**, Cambridge, v. 244, p. 299 – 313, 1986.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM C. **The Neural Crest**. 2^a ed. Cambridge University Press, 1999, p. 1 – 58.

MARTINS-GREEN,M.; ERICKSON, C. A. Basal lamina is not a barrier to neural crest cell emigration: documentation by TEM and by immunofluorescent and immunogold labeling. **Development**. Great Britain, U. K., v. 101, p. 517-533, 1987.

PATTEN, B. M. **Early embryology of the chick**. 4. ed. New York: McGraw Hill, 1957.

PERRIS, R.; ERICKSON, C. A. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. **Dev. Biol.**, Academic Press U. S. A., v. 159, p. 60 – 74, 1993.

NEWGREEN, D, F; ERICKSON, C. A. The migration of neural crest cell. **Int. Rev. Cytol.** 10, 89 – 145, 1986.

PERRIS, R. et al. Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyalunoran-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. **Development.** Great Britain, U. K., v. 127, p. 2823-2842, 2000.

PORTELLA, A. C. P.; Análise da influencia da estrutura e composição do somito sobre o padrão migratório de células da crista neural em embriões de galinha Sedosa japonesa e Leghorn. Monografia apresentada para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

REEDY, M. V.; FARACO, C. D.; ERICKSON C. A . Specification and Migration of Melanoblasts at the Vagal Level and in Hyperpigmented Silkie Chickens. **Dev. Dyn.**, New York, v. 213, p. 476 – 485, 1998b.

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W. ; KEYNES R. J. The migration of neural crest cells and growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. **J. Embryol. Exp. Morph.** Great Britain, U. K., v. 90, p. 437-455, 1985.

SPENCE, M. S.; YIP, J.; ERICKSON, C. A. The dorsal neural tube organizes the dermamyotome and induces axial myocytes in the avian embryo. **Development.** Great Britain, U. K., v. 122, p. 231-241, 1996.

STERN, C. D.; SISODIYA, S. M.; KEYNES, J. R. Interactions between neurites and somite cells: inhibition and stimulation of nerve growth in chick embryo. **J. Embryol. Exp. Morph.**, Great Britain, U. K., v. 91, p. 209-226, 1986.

WOLPERT, L. **Biologia do desenvolvimento.** 1. ed. São Paulo: Artes médicas sul, 2000.

ZIMMERMANN, D. R.; LANDOLT, R. M.; VAUGHAN, L., WINTERHALTER, K. H. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. **Development**. Great Britain, U. K., v. 121, p. 2303-2312, 1995.