

ANA CAROLINA PORTUGAL PORTELLA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO SOMITO
SOBRE O PADRÃO MIGRATÓRIO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM
EMBRIÕES DE GALINHA SEDOSA JAPONESA E LEGHORN**

**CURITIBA
2002**

ANA CAROLINA PORTUGAL PORTELLA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA 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 a disciplina Estágio II em Biologia Celular como requisito a conclusão do Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cloris Ditzel Faraco

**CURITIBA
2002**

RESUMO

Embriões de aves são muito semelhantes aos embriões de mamíferos na complexidade morfológica e no curso geral do desenvolvimento. As células que irão formar os somitos encontram-se em duas largas bandas que correm longitudinalmente ao lado da notocorda e tubo neural já formado, a mesoderme paraxial. Ocorre uma regionalização da mesoderme paraxial para formar os somitômeros, estruturas que dão origem aos somitos. Os somitos são organizados em dermatômo, miotômo e esclerôto por sinais provenientes da notocorda e tubo neural e vão contribuir com a formação da derme, músculos esqueléticos e vértebras, respectivamente. A crista neural é uma população de células que migra da porção dorsal do tubo neural, logo após o fechamento do mesmo após o término da neurulação. No tronco de embriões de aves, as células da crista neural migram por duas vias: a ventral, entre o tubo neural e os somitos, e a dorsolateral, entre a ectoderme e os somitos. As células que migram pela via ventral vão dar origem a células do Sistema Nervoso, a as que migram pela via dorsolateral vão dar origem a melanócitos. Na galinha Sedosa japonesa, as células que migram pelas vias dorsolateral e ventral vão dar origem a melanócitos, diferente da raça Leghorn, onde são observadas moléculas inibidoras de precursores de melanócitos na via ventral. É importante saber qual a interação entre as células de crista neural e os somitos destes embriões, buscando entender o possível papel dos somitos e componentes de matriz extracelular no direcionamento das células. Foram realizadas análises morfológicas dos somitos e citoquímicas que indicam a presença de ácido hialurônico em troncos de embriões das duas raças.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÕES.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Embriões de aves são muito semelhantes aos embriões de mamíferos na complexidade morfológica e no curso geral do desenvolvimento. O óvulo é fertilizado e inicia o processo de clivagem enquanto ainda está no oviduto da galinha. O citoplasma e o núcleo do ovócito estão confinados a apenas uma pequena região com poucos milímetros de diâmetro sobre a massa de vitelo. O processo de clivagem resulta em uma blastoderme circular com algumas células de espessura. A blastoderme organiza-se em duas camadas de células separadas por uma cavidade, o espaço subgerminal. A camada superior é o epiblasto que dará origem ao embrião propriamente dito e a camada inferior, o hipoblasto que se localiza abaixo do espaço subgerminal, logo acima da massa de vitelo, dará origem a estruturas extra-embriônicas. A gastrulação no embrião de ave inicia-se com a formação da linha primitiva que representa a região onde as células do epiblasto estão proliferando e migrando para o interior da blastocele para dar origem a células endodérmicas e mesodérmicas. Durante a gastrulação, na extremidade anterior da linha primitiva forma-se uma condensação de células, o nó de Hensen. Quando a maior parte da mesoderme e endoderme migrou para o interior da blastocele, a linha primitiva e o nó de Hensen começam a regredir. As células que migram do nó de Hensen enquanto este está regredindo darão origem à notocorda e contribuirão para a formação dos somitos (Fig. 1) (Wolpert, 2000).

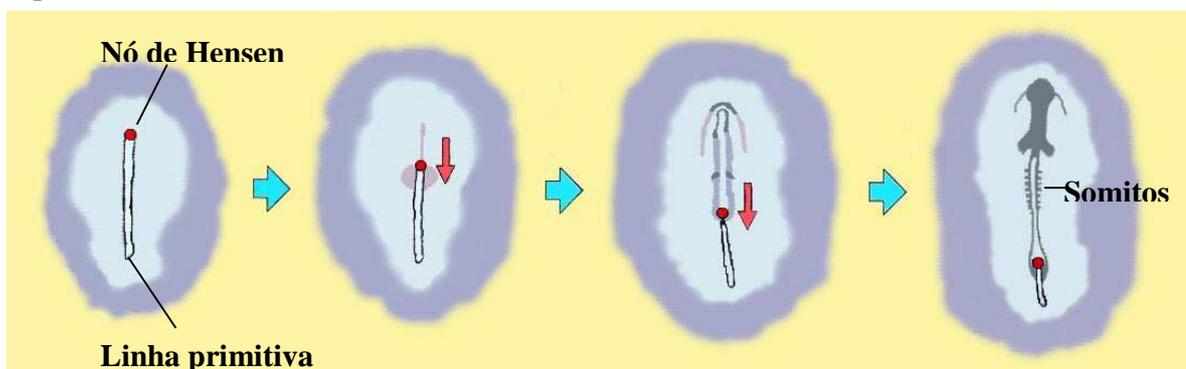


FIG. 1 – Esquema da gastrulação e formação dos somitos em um embrião de ave. Modificado a partir de Wolpert, 2000.

As células que irão formar os somitos encontram-se em duas largas bandas que correm longitudinalmente ao lado da notocorda e tubo neural já formado, a mesoderme paraxial. Ocorre uma regionalização da mesoderme paraxial no embrião de ave que se inicia na extremidade anterior da cabeça e prossegue em direção à cauda. Esses segmentos recém formados são denominados somitômeros (Fig. 2) e vão originar os somitos. Os pares de somitômeros vão sendo colocados logo abaixo da linha primitiva, ao lado da notocorda à medida que o nó de Hensen regride. O primeiro par de somitos origina-se do oitavo par de somitômeros sendo que os outros sete pares de somitômeros mantêm sua organização original sem segmentação evidente.

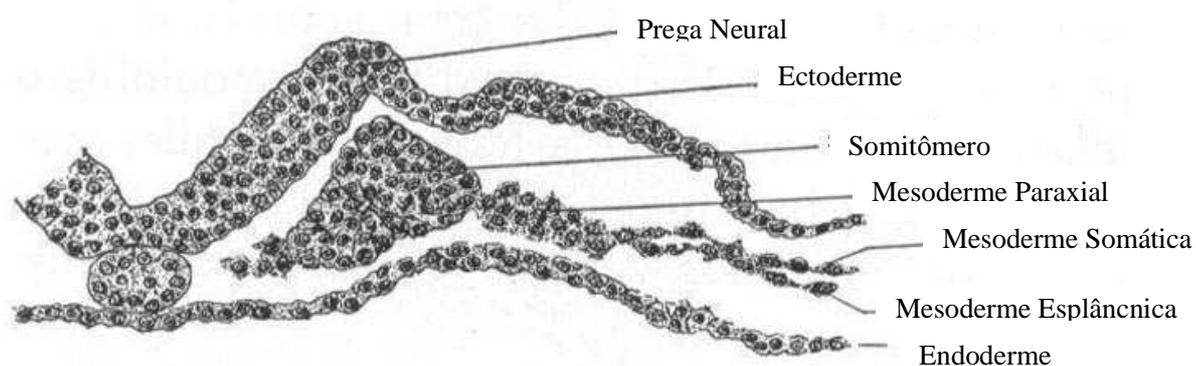


FIG. 2 – Esquema de embrião de ave, apresentando um somitômero modificado a partir de Patten, 1957.

Os somitômeros são transformados em somitos quando suas células adquirem características epiteliais e estabelecem contatos intercelulares (Carlson, 1996). 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 (Fig. 3) respectivamente (Spence et al, 1996).

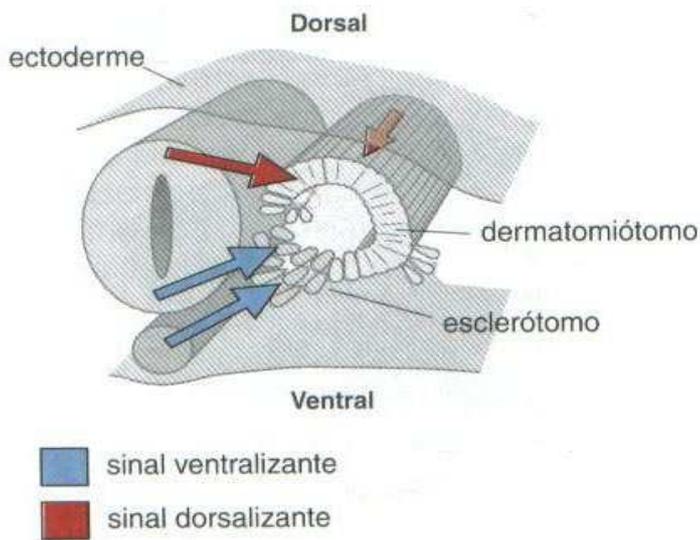


FIG. 3 – Esquema da ação de sinais indutores dorsais e ventrais sobre a organização do somito, vindos do tubo neural e notocorda respectivamente. Retirado e modificado de Wolpert, 2000.

O somito então se organiza em três partes distintas, o esclerótomo, o miótomo e o dermatômo (Fig. 4).

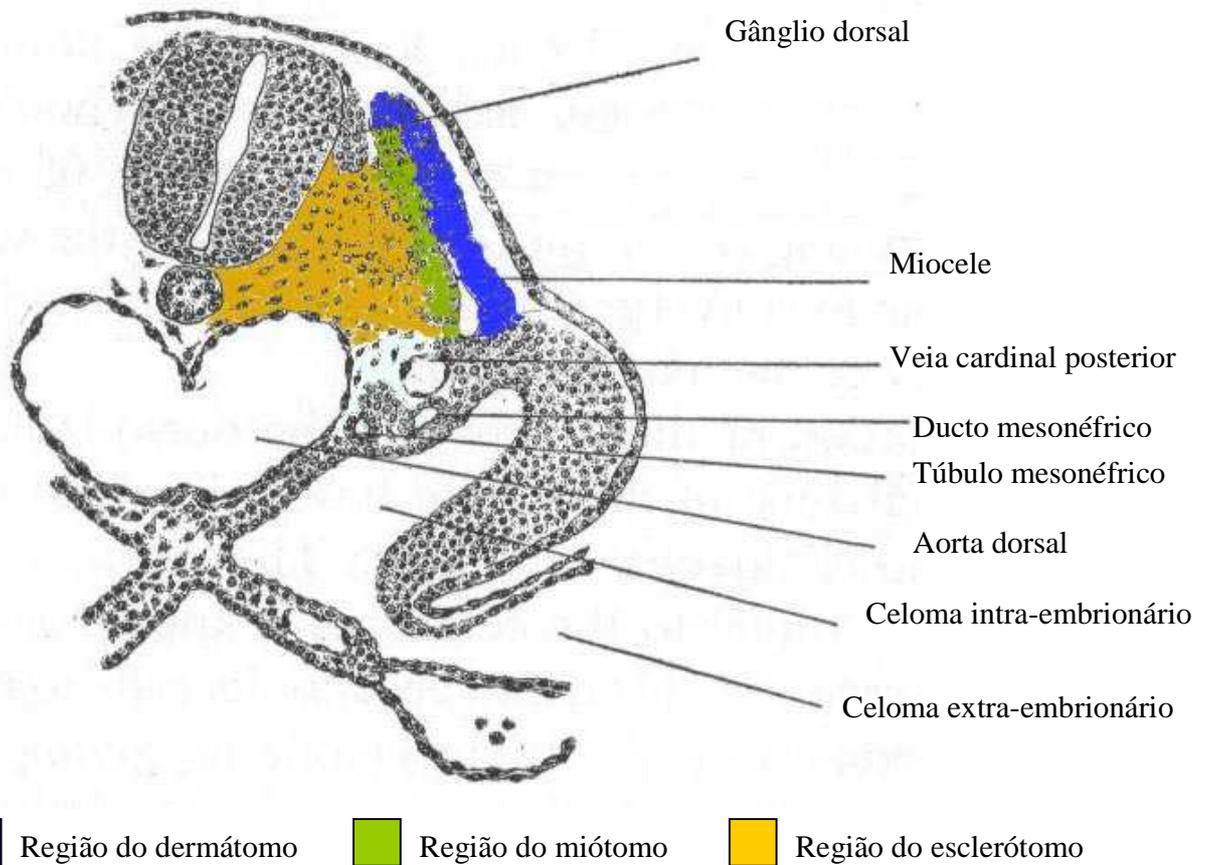


FIG. 4- Esquema de embrião de ave com o dermatômo, miótomo e esclerótomo já delimitados. Modificado a partir de Patten, 1957.

O esclerótomo localiza-se mais ventralmente e suas células possuem características mesenquimais; elas convergem em direção à notocorda, envolvendo-a, e dão origem à coluna vertebral (vértebras e discos intervertebrais). Durante a formação do esclerótomo a parte dorsolateral do somito paralela à ectoderme tem seus limites definidos e suas características epiteliais mantidas. Este pedaço do somito é denominado dermatomo, e suas células vão contribuir para a formação das camadas profundas da derme. A parte dorso-medial do somito, localizada entre o dermatomo e o esclerótomo, é denominada miótomo (Fig. 5).

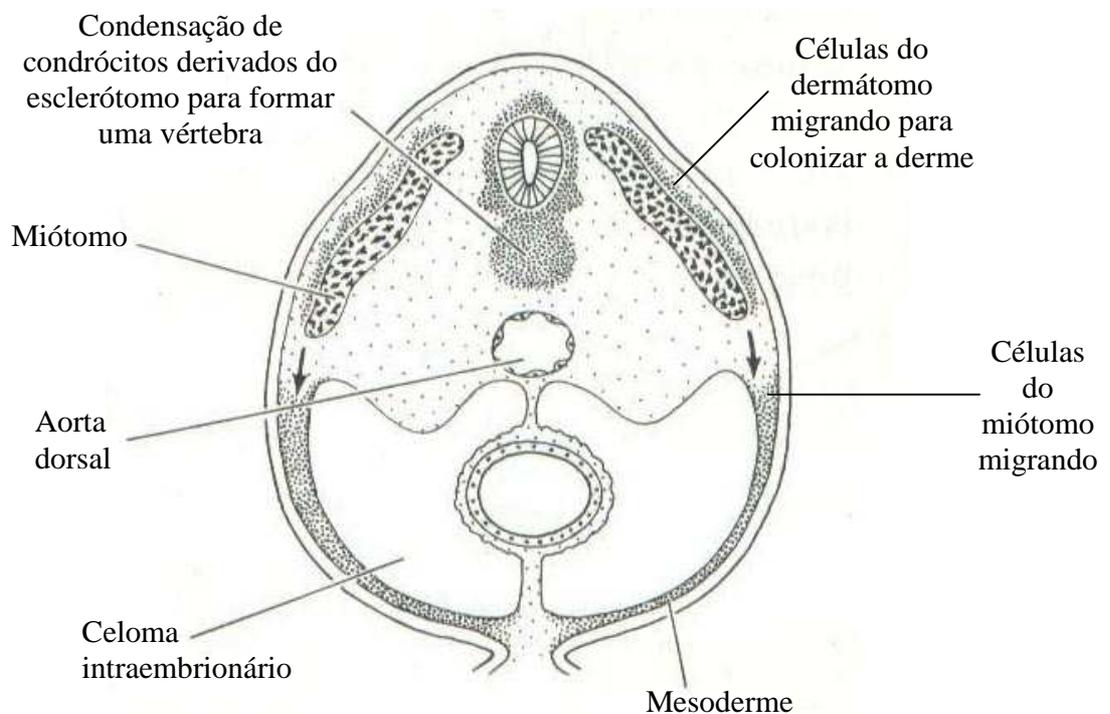


FIG. 5 - Esquema de embrião de ave, com as células do somito migrando. Modificado a partir de Gilbert, 1997.

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, 2000; Patten, 1957).

A crista neural é uma população de células que migra da porção dorsal do tubo neural, logo após o fechamento do mesmo ao término da neurulação. Embora seja constituída inicialmente por poucas células e permaneça pouco tempo no desenvolvimento embrionário, é realmente notável a capacidade migratória, proliferativa e a pluripotencialidade de suas células. As células da crista neural migram para diversos lugares no corpo do embrião, onde se alojam e dão origem a diversos tipos celulares como melanócitos, neurônios e células da glia. A análise da crista neural engloba quase todas as características do desenvolvimento tais como modelo de formação, determinação, migração direcionada e diferenciação, sendo ela, portanto um ótimo modelo para estudos. No tronco de embriões de aves as primeiras células que deixam a crista neural migram pela via ventral, entre o tubo neural e os somitos.

FIG. 4 – Esquema da do destino e da migração de células da crista neural no embrião de ave. Retirado e modificado a partir de Wolpert, 2000.

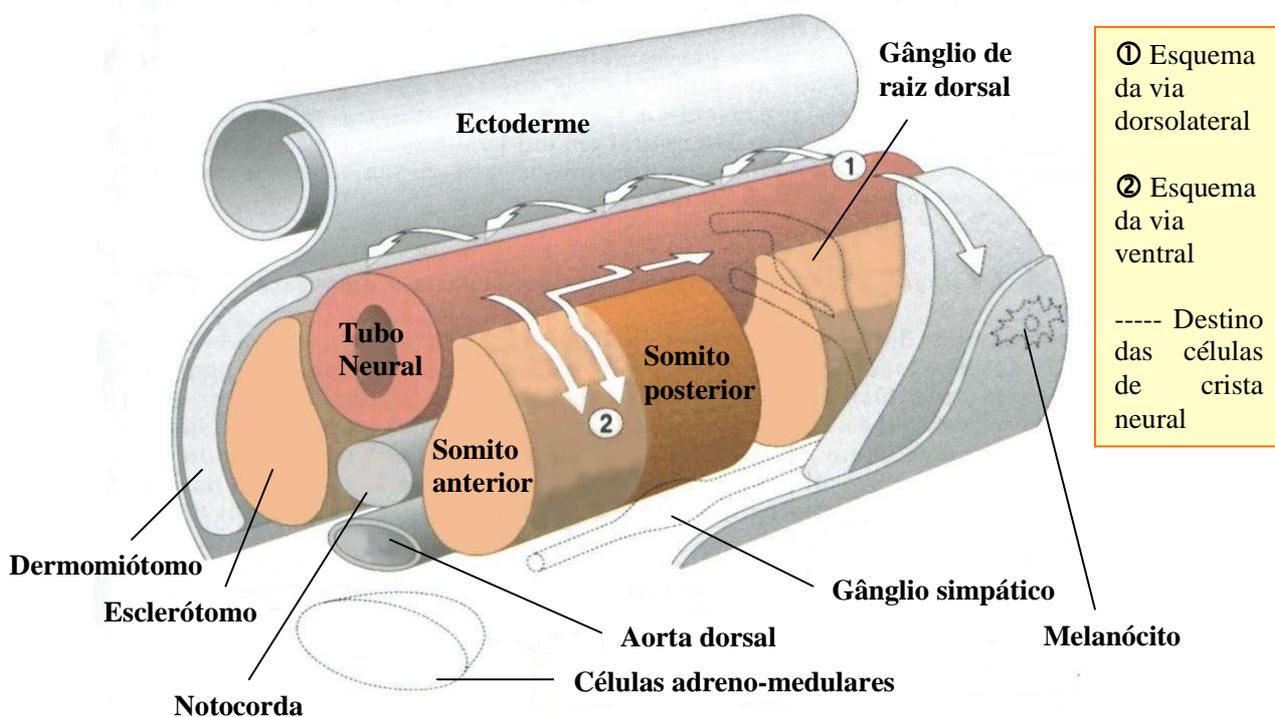


FIG. 6 – Esquema do destino e migração de células de crista neural em embrião de ave. Modificado a partir de Wolpert, 2000.

Estas células vão dar origem a neurônios, células da medula adrenal e células de Schwann. A outra via de migração das células da crista é a dorsolateral, que só se inicia após o término da migração ventral. Na via dorsolateral as células migram entre a ectoderme e os somitos e vão dar origem a melanócitos, invadindo a ectoderme (Fig. 6) (Le Douarin & Kalcheim 1999). Algumas células de crista neural que estão migrando ventralmente entre o tubo neural e os somitos invadem os somitos torácicos e lombares. Pouco antes da entrada de células de crista neural nos somitos, eles organizam-se em dermátomo, miótomo e esclerótomo, o que pode estimular a entrada destas células. A lamina basal do miótomo surge junto com esta entrada sugerindo 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 que migram ventralmente passam através da lateral do esclerótomo, mas somente pela parte rostral de cada somito. À medida que o somito desenvolve-se, o número de células de crista neural dentro dele aumenta rapidamente. Estas células estão sempre restritas à metade rostral do somito (apesar dos somitos não apresentarem sinais morfológicos de divisão em metade rostral e caudal neste estágio), onde ocupam o espaço abaixo do dermomiótomo e progressivamente penetram fundo no esclerótomo, enquanto aparentemente evitam a notocorda, e permanecem na metade rostral do esclerótomo até saírem para colonizar outras áreas. A fibronectina e a laminina estão igualmente distribuídas nas metades rostral e caudal de cada somito, logo, não influenciam qualquer preferência de células de crista neural pela metade rostral do somito (Rickmann et al, 1985). Um ou mais inibidores provavelmente estão presentes na superfície das células da metade caudal do esclerótomo, enquanto um estimulante pode estar associado com a metade cranial do somito (Stern et al, 1986). A matriz extracelular da notocorda possui moléculas que repelem as células de crista neural que migram ventralmente, mas que, por

outro lado, atraem as células mesenquimais do esclerótomo. Estas moléculas de matriz que repelem as células de crista neural e atraem as células do esclerótomo podem ser o condroitin sulfato ou alguma molécula associada a ele e/ou o ácido hialurônico respectivamente (Newgreen et al, 1986).

Na galinha Sedosa japonesa, tanto as células que migram pela via dorsolateral, quanto as que migram pela via ventral mais tardiamente vão dar origem a 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 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). A migração de precusores de melanócitos bem como a distribuição de algumas moléculas de matriz é diferente se compararmos as duas raças. Já que a estrutura do somito foi descrita como tendo um papel direcionador de migração inicial das células de crista neural, é importante saber como estão arranjados e organizados morfológicamente os somitos em embriões mais desenvolvidos, quando as células de linhagem melanocítica estão migrando, e qual a interação entre as células da crista neural e os somitos de embriões de raças diferentes, buscando entender um possível papel da arquitetura do somito e/ou componentes de sua matriz-extracelular no direcionamento de migração destas células.

2. OBJETIVOS

Realizar a descrição morfológica dos somitos de embriões de aves das raças Sedosa Japonesa (branca) e Leghorn (branca) buscando o possível papel destes na migração de células de crista neural de linhagem melanocítica.

Utilizando métodos citoquímicos identificar a presença e a distribuição de moléculas de matriz extracelular dos somitos que possam influenciar ou inibir a migração de células provenientes de crista neural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Obtenção dos ovos

Ovos embrionados de galinhas Sedosa japonesa e Leghorn fornecidos pelo aviário da Universidade Federal do Paraná, previamente limpos, foram incubados a 38° C até atingirem os estágios 24, 26 e 28 (Fig. 7) do desenvolvimento (Hamburger & Hamilton, 1951) que correspondem respectivamente a 4, 4 1/2 e 5 1/2 dias de incubação.

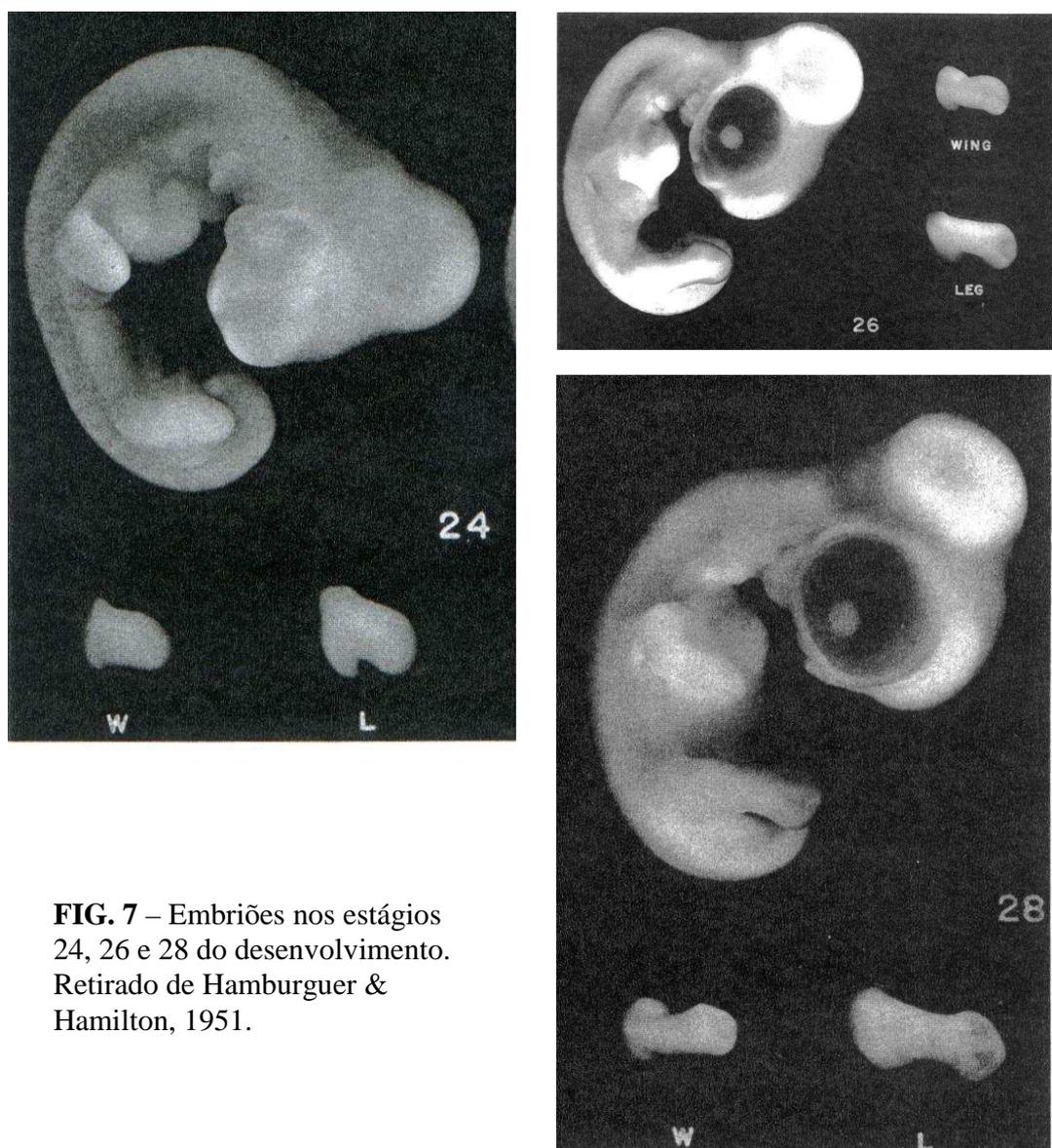


FIG. 7 – Embriões nos estágios 24, 26 e 28 do desenvolvimento. Retirado de Hamburger & Hamilton, 1951.

3.2) Obtenção dos embriões

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

3.3) Fixação para Histoiresina

Os embriões foram fixados em paraformaldeído 2% em PBS por duas horas, lavados em PBS 1% e tiveram a região do tronco recortada.

3.4) Desidratação e Embebição em Histoiresina JB4

Depois de fixados, os embriões foram desidratados em uma série crescente de etanol, submetidos a um banho em histoiresina e etanol na proporção de 1/1 durante a noite, a 4° C e a um banho em histoiresina pura por 4 dias, a 4° C.

3.5) Inclusão em Histoiresina

Os embriões foram colocados em solução de histoiresina pura e acelerador na proporção de 1/15 e submetidos á vácuo por uma noite para polimerização.

3.6) Microtomia para Histoiresina

Os blocos foram submetidos a microtomia e os cortes de 3µm da região do tronco obtidos foram coletados em laminas.

3.7) Coloração

As laminas foram coradas por Hematoxilina de Harrys por 45 segundos e por Eosina por 1 minuto e depois de secas montadas com Permount para posterior análise e registro fotográfico em microscópio Zeiss Axiophot.

3.8) Inclusão em Paraplast

Os embriões foram fixados em Bouin por uma hora, lavados em PBS e tiveram a região do tronco recortada. As regiões do tronco foram desidratadas e incluídas em Paraplast.

3.9) Microtomia para Paraplast

Cortes de 5 μ m foram obtidos pela secção em micrótomo da região do tronco dos embriões incluídos em Paraplast, os quais foram coletados em laminais previamente gelatinizadas.

3.10) Determinação da presença de Ácido Hialurônico

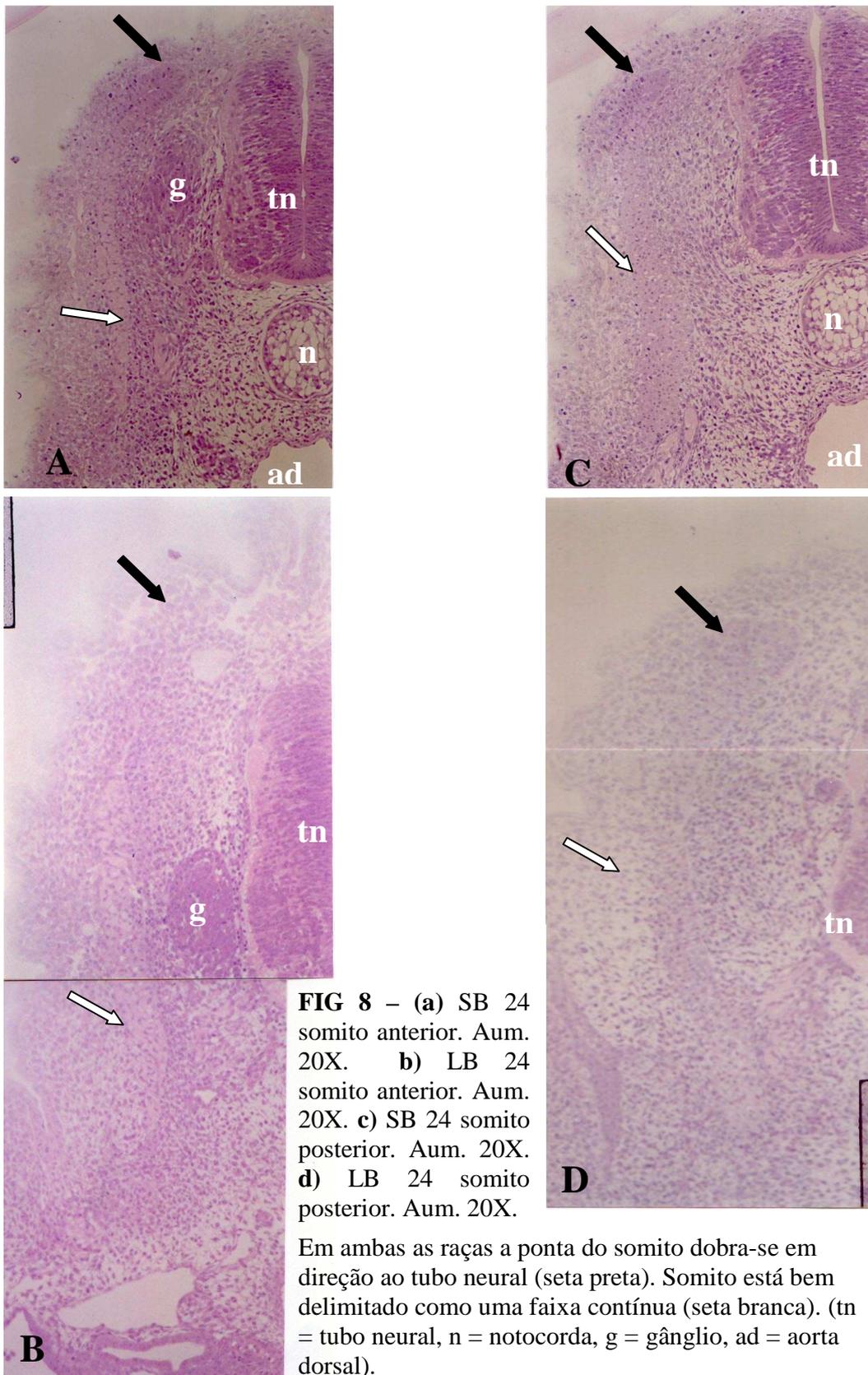
Os cortes obtidos dos embriões incluídos em Paraplast foram desparafinizados, hidratados em uma série decrescente de etanol, e lavados em água destilada. As laminais utilizadas como controle foram tratadas com tampão fosfato 1M com pH 6,7 e as laminais utilizadas para detectar a presença de ácido hialurônico foram tratadas com Hialuronidase (SIGMA) diluída em tampão fosfato 1M, pH 6,7, a 37° C, por 3 horas. Os cortes foram lavados em água destilada e corados com Alcian Blue 1% em ácido acético 3% e Vermelho neutro aquoso 0,5%. As laminais foram desidratadas em uma série crescente de etanol e montadas em Permount para posterior análise e registro fotográfico em microscópio Zeiss Axiophot.

4. RESULTADOS

A descrição da morfologia dos somitos dos embriões incluídos em historesina foi feita por comparações entre a organização dos somitos anteriores e posteriores de embriões de diferentes raças no mesmo estágio de desenvolvimento. Embriões das raças Sedosa japonesa e Leghorn branca no estágio 24 não apresentaram diferenças entre seus somitos (Fig. 8). A localização e arquitetura do somito no embrião é a mesma tanto no somito anterior quanto no somito posterior em ambas as raças. Embriões de Sedosa japonesa e Leghorn no estágio 26 apresentaram uma pequena diferença entre seus somitos anteriores, as células que ocupam o espaço entre o gânglio e o somito no embrião da raça Leghorn apresentaram-se mais compactadas em relação às células que ocupam o mesmo espaço no embrião da raça Sedosa japonesa (Fig. 9c e 9d), porém, os somitos posteriores parecem iguais para as duas raças (Fig. 9a e 9b). Os somitos apresentam várias camadas celulares e sua organização epitelial ainda está presente porém, não como a organização epitelial característica de somitos de embriões mais jovens. As células epiteliais começam a dar lugar a células mesenquimais. Os somitos dispõem-se como faixas alongadas ao lado do tubo neural e notocorda, com a parte mais dorsal dobrada em direção ao tubo neural. Nesta parte do somito ainda restam algumas células de caráter epitelial. Embriões de Leghorn e Sedosa branca no estágio 28 apresentaram uma diferença na disposição das células que ocupam o espaço entre o somito e o tubo neural para ambos os somitos, anterior e posterior. Estas células encontram-se mais compactadas nos embriões de Leghorn que nos embriões da raça Sedosa japonesa (Fig. 10).

Os embriões de ambas as raças nos estágios 26 e 28 tratados com Hialuronidase apresentaram-se positivos para a presença de ácido hialurônico. A presença de ácido hialurônico foi detectada na matriz extracelular da notocorda, na região do broto da asa e logo abaixo da ectoderme em embriões da raça Sedosa branca nos estágios 26 (Fig. 11) e 28 (Fig. 12) e em embriões da raça Leghorn branca no estágio 26 (Fig. 13)

e 28 (Fig. 14). Além do ácido hialurônico, algumas moléculas como o condroitin sulfato e outras proteínas sulfatadas também coram-se pelo Alcian Blue. A presença do ácido hialurônico no embrião é detectada através da imagem negativa deixada pela digestão da glicosaminoglicana pela enzima Hialuronidase. As colorações azuis que permanecem nos embriões tratados com Hialuronidase são devido a presença de moléculas, que não o ácido hialurônico, que apresentam afinidade ao Alcian Blue.



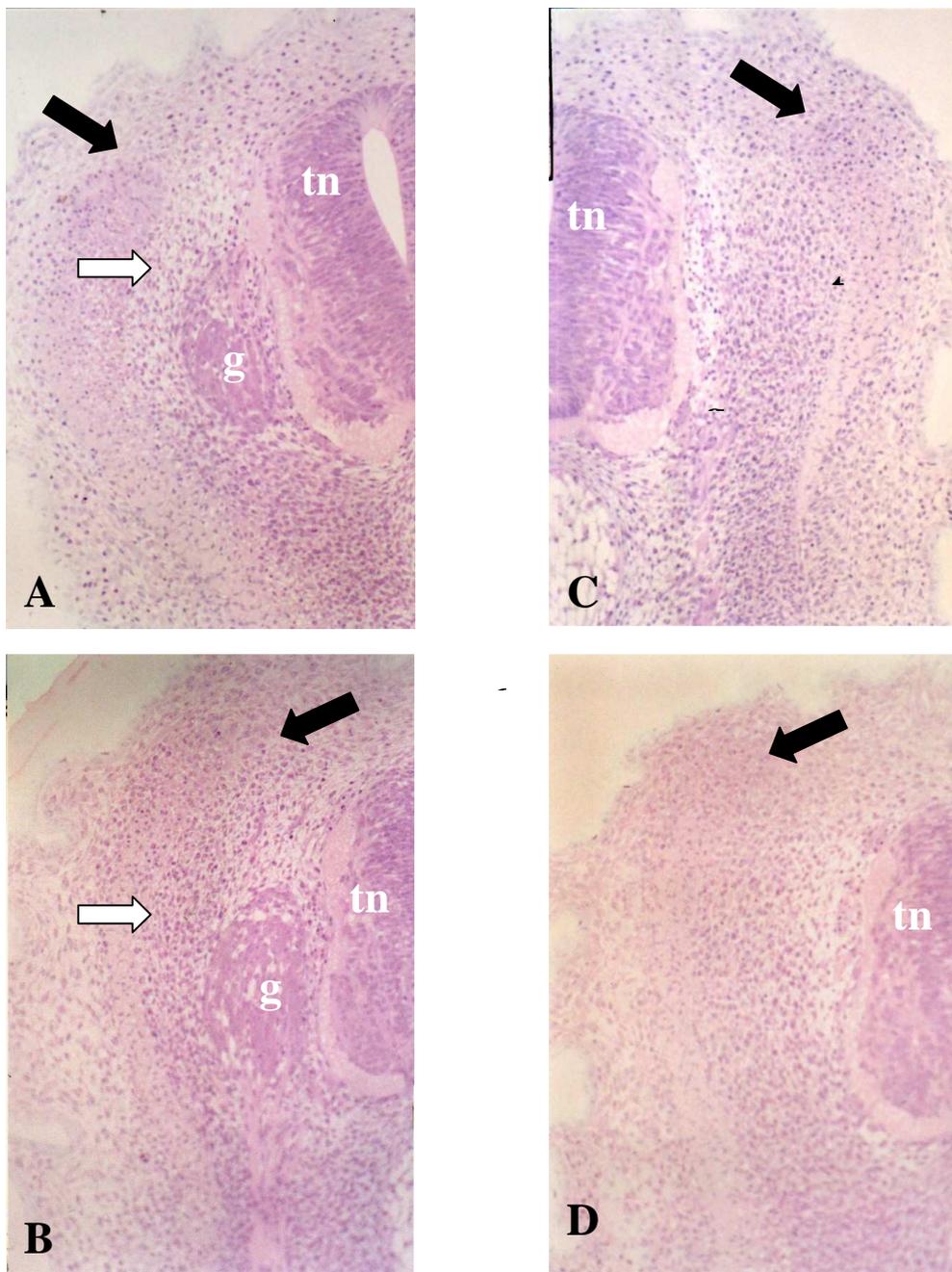


FIG 9- (a) SB 26 somito anterior. Aum. 20X. (b) LB 26 somito anterior. Aum. 20X. (c) SB 26 somito posterior Aum. 20X. (d) LB 26 somito posterior Aum. 20X. O somito ainda apresenta um arranjo epitelial e dispõe-se como uma faixa contínua bem delimitada com a ponta em direção ao tubo neural (seta preta). No espaço entre o somito anterior e o gânglio no embrião de Leghorn há um aglomerado de células (Fig. B, seta branca). O somito anterior do embrião de Sedosa (Fig. D) já não apresenta este aglomerado (seta branca). Não há diferenças entre os somitos posteriores entre as duas raças neste estágio. (tn = tubo neural, n = notocorda, g = gânglio).

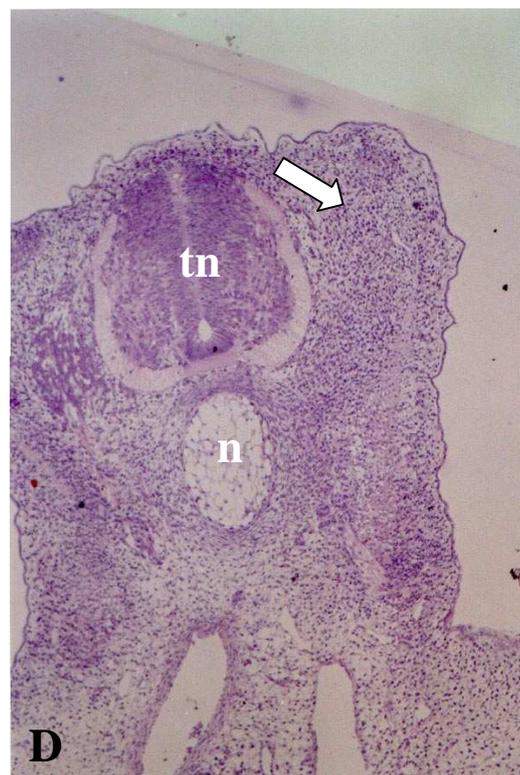
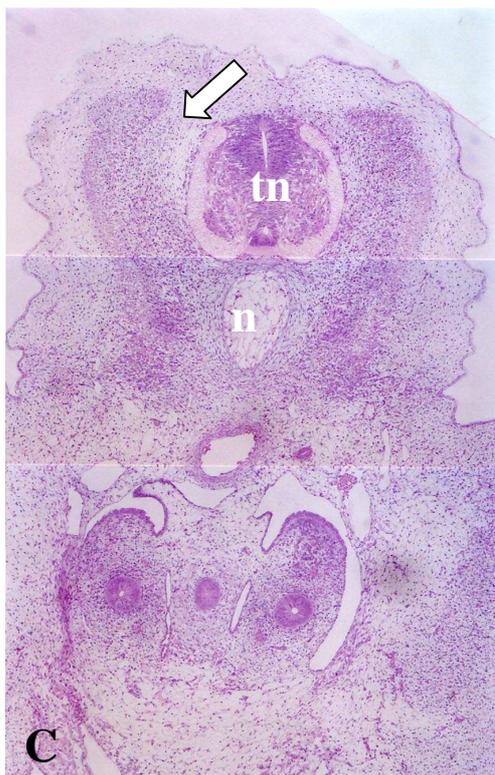
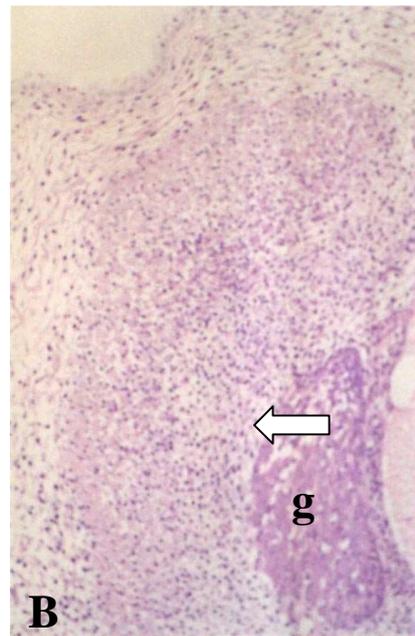
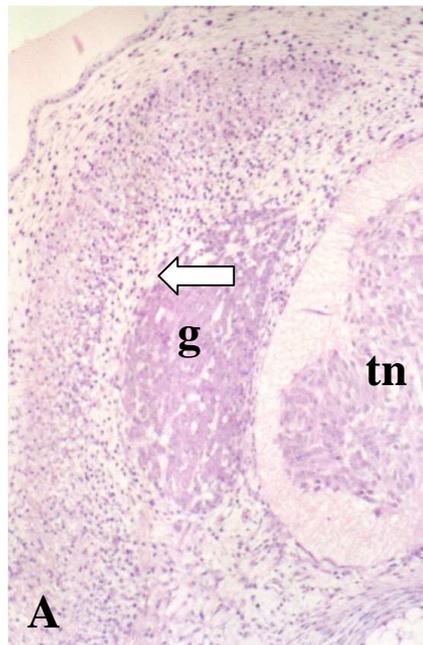


FIG 10 – (a) SB 28 somito anterior. Aum. 20X. b) LB 28 somito anterior. Aum. 20X. c) SB 28 somito posterior. Aum. 20X. d) LB 28 somito posterior. Aum. 20X As células que estão entre o somito anterior e o gânglio e entre o somito posterior e o tubo neural nos embriões de SB 28 encontram-se menos compactadas que as células encontradas no mesmo espaço em embriões de LB 28 (setas brancas). (tn = tubo neural, n = notocorda, g = gânglio).

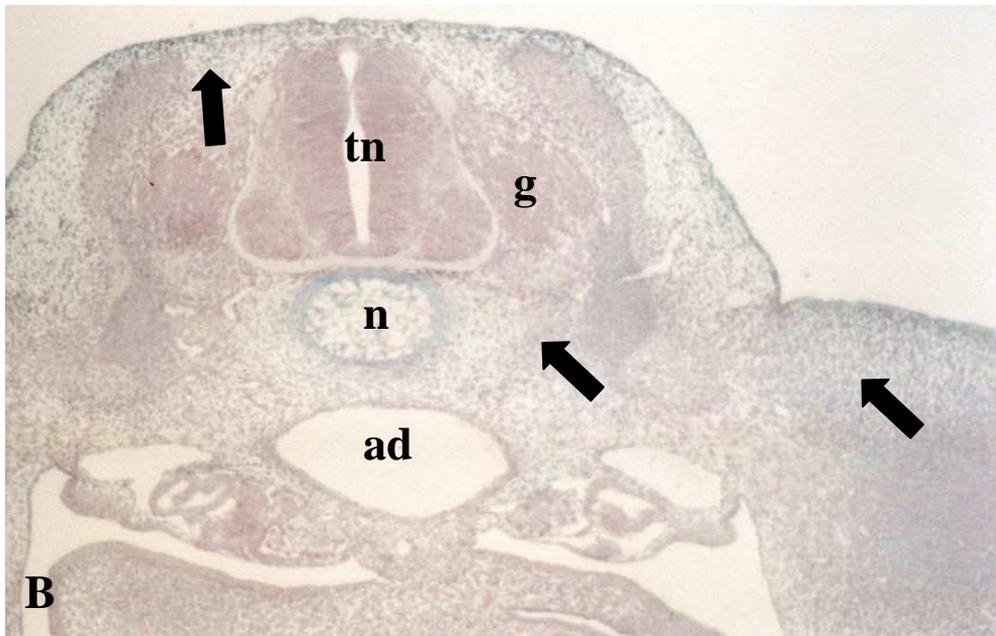
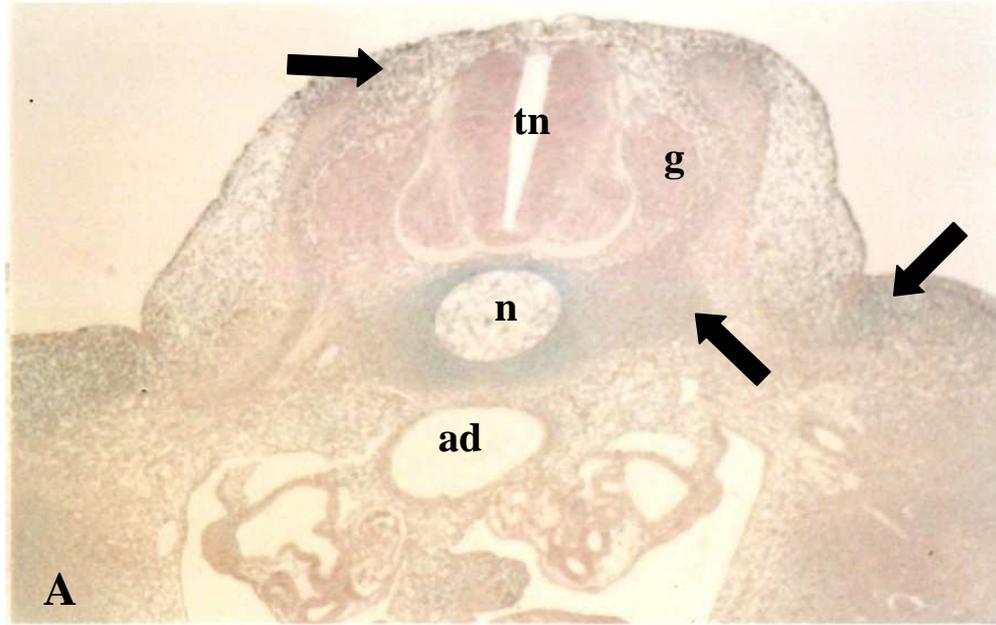


FIG 11- (a) SB 26 somito anterior. Aum. 10X. Notar coloração azul pelo Alcian Blue ao redor da notocorda, na região do broto da asa e logo abaixo da ectoderme (setas). **b)** SB 26 somito anterior. Lamina tratada com Hialuronidase. Aum. 10X. Notar que a coloração pelo Alcian Blue ao redor da notocorda, na região do broto da asa e abaixo da ectoderme diminuiu, devido a retirada do ácido hialurônico pela ação da enzima (setas).

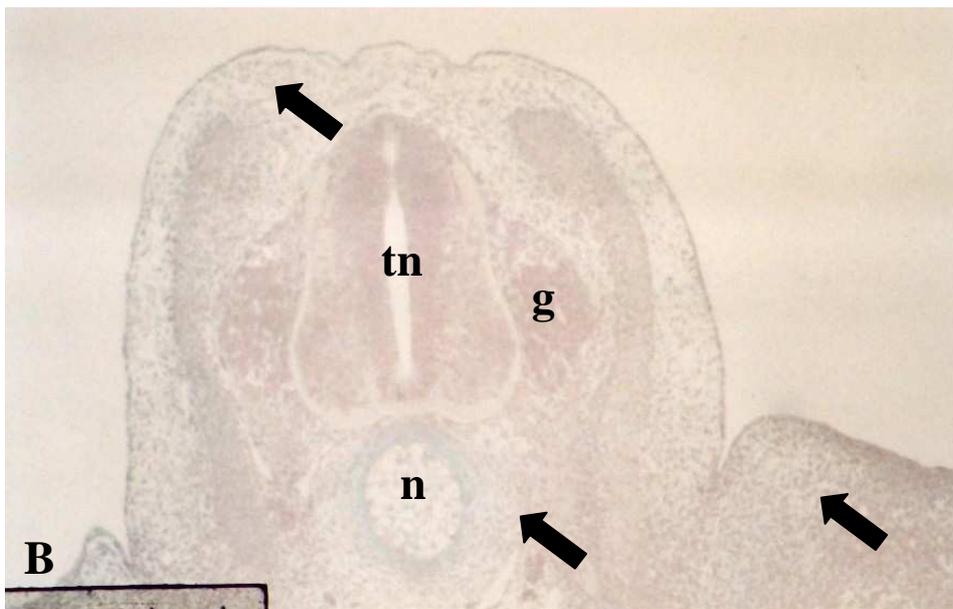
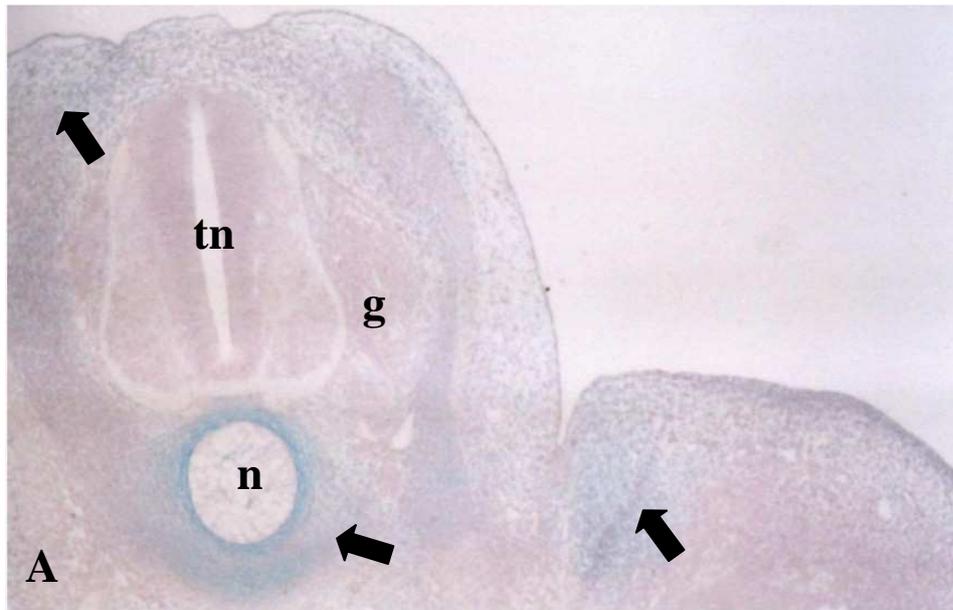


FIG. 12- (a) LB 26 somito anterior. Aum. 10X. Coloração forte do Alcian Blue ao redor da notocorda, na região do broto da asa e logo abaixo da ectoderme, local onde provavelmente há ácido hialurônico (setas). (b) LB 26 somito anterior. Lamina tratada com Hialuronidase. Aum. 10X. A coloração com Alcian Blue ao redor da notocorda, na região do broto da asa e abaixo da ectoderme diminui (imagem negativa do ácido hialurônico), a pouca coloração que permanece se deve a outras moléculas presentes. (tn = tubo neural, n = notocorda, g = gânglio).

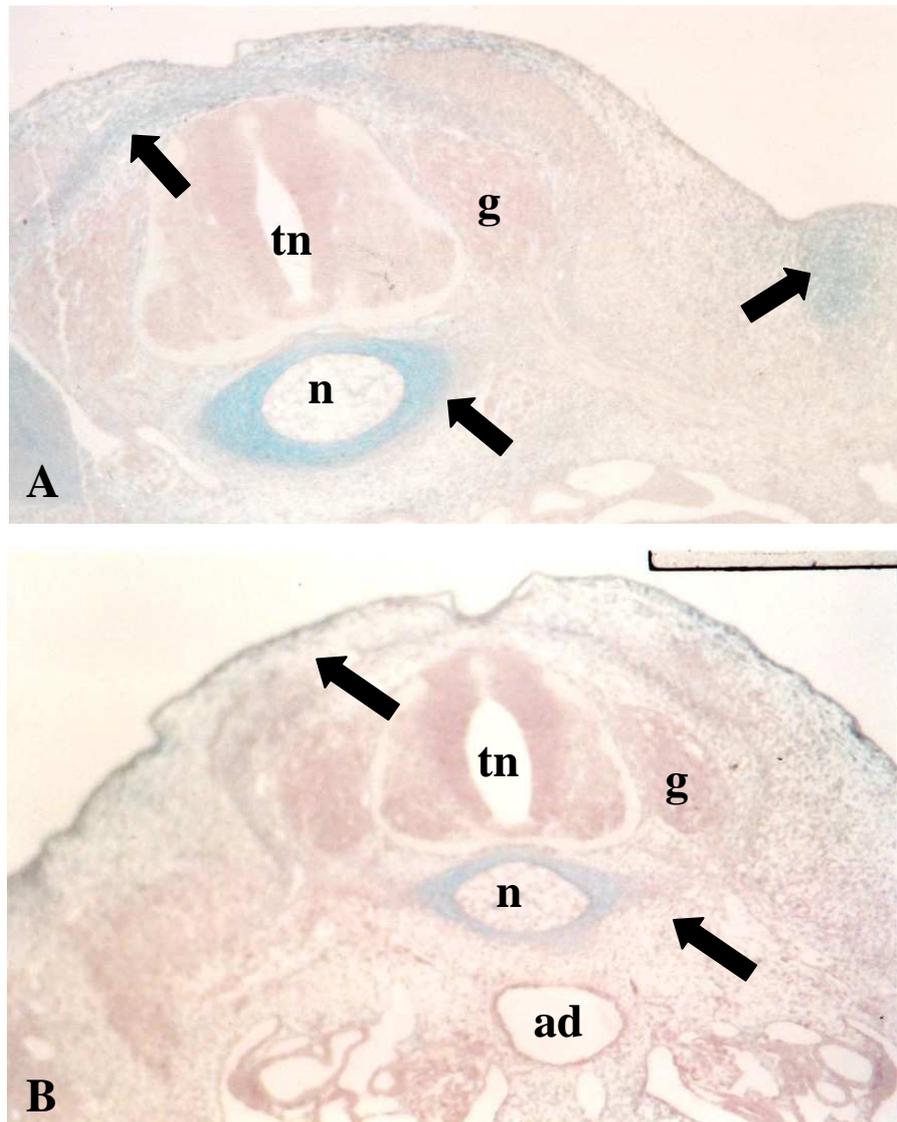


FIG. 13 – (a) SB 28 somito anterior. Aum. 10X. Coloração azul intensa ao redor da notocorda, região do broto da asa e abaixo da ectoderme devido a presença de ácido hialurônico e outras moléculas (setas). (b) SB 28 somito posterior. Lamina tratada com hialuronidase. Aum. 10X. A intensidade da coloração azul diminuiu, devido a retirada do ácido hialurônico (setas). (tn = tubo neural, n = notocorda, g = gânglio, ad = aorta dorsal).

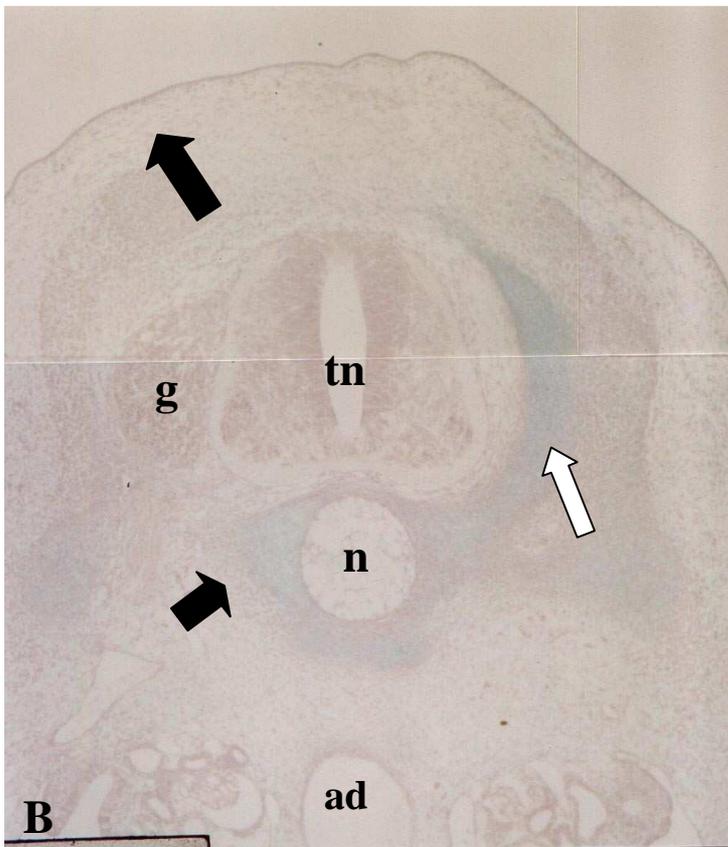
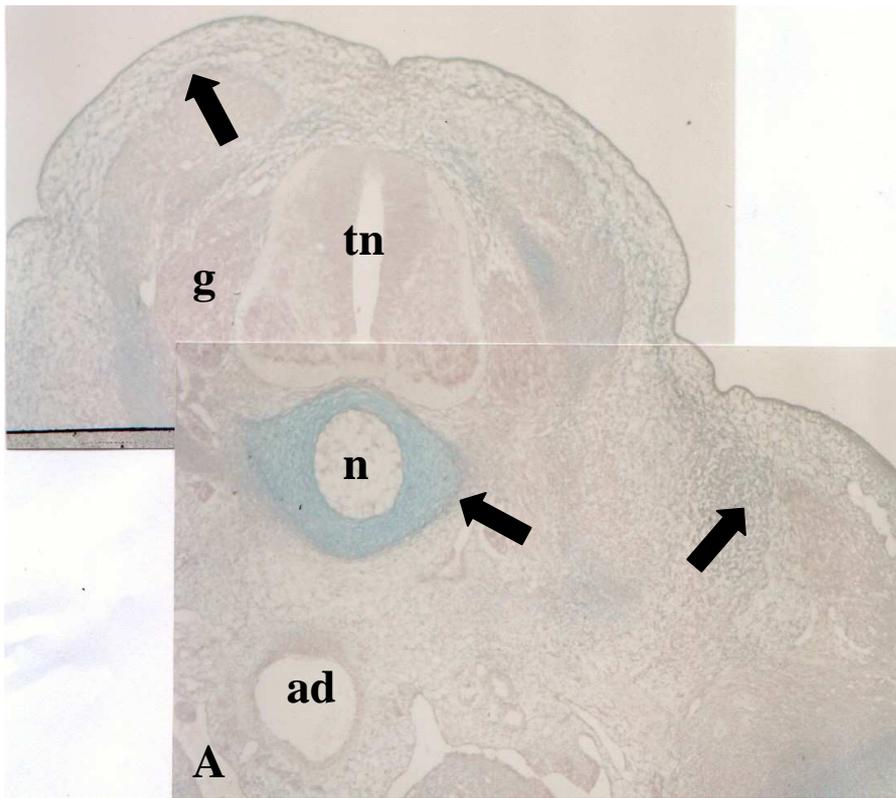


FIG. 14 - (a) LB 28 somito anterior. Aum. 10X. Coloração azul intensa ao redor da notocorda, na região do broto da asa e abaixo da ectoderme, devido à presença do ácido hialurônico e outras moléculas (setas). **b)** LB 28. Lamina tratada com hialuronidase. Aum. 10X. Coloração mais fraca ao redor da notocorda e abaixo da ectoderme devido à digestão do ácido hialurônico pela ação da hialuronidase, imagem negativa (setas pretas). Neste corte, no lado sem gânglio (somito posterior), outras moléculas que não o ácido hialurônico coram-se pelo Alcian Blue (seta branca). (tn = tubo neural, n = notocorda, g = gânglio, ad = aorta dorsal).

5. DISCUSSÃO

Os somitos de embriões no estágio 24 de ambas as raças não apresentaram diferenças morfológicas. Os embriões da raça Leghorn branca no estágio 26 possuem, no espaço entre o somito anterior e o gânglio, um grupo de células bem compactadas, com poucos espaços intercelulares. Na raça Sedosa, no mesmo estágio de desenvolvimento, este grupo de células localizado entre o somito anterior e o gânglio encontra-se disposto de maneira mais frouxa, com mais espaços intercelulares. Embriões da raça Leghorn no estágio 28 apresentaram células compactadas entre o somito anterior e o gânglio e entre o somito posterior e o tubo neural. Na raça Sedosa japonesa, os embriões não apresentaram esta compactação de células. Observou-se que à medida que o embrião de Leghorn se desenvolve, a compactação destas células torna-se mais evidente sendo no estágio 28 bem clara, o que não ocorre em embriões da raça Sedosa japonesa. O agrupamento de células neste local pode surgir em estágios mais tardios quando as células de crista neural precursoras de melanócitos estão migrando, e pode impedir que estas migrem por esta via colonizando regiões ventrais na raça Leghorn. Na ave Sedosa japonesa este grupo de células compactadas não é observado e nesta raça as células de crista neural precursoras de melanócitos foram observadas migrando por esta via, colonizando regiões ventrais. O agrupamento de células observado em embriões da raça Leghorn pode agir como uma barreira física, ou ainda como fonte de uma matriz extracelular ou moléculas associadas à membrana das células que possam agir como barreiras químicas impedindo a migração de precursores de melanócitos ventralmente.

Aves da raça Leghorn e Sedosa japonesa demonstraram-se positivas para a presença de ácido hialurônico. Embriões no estágio 26 e 28 de desenvolvimento, apresentaram a matriz extracelular da notocorda e das células localizadas logo abaixo da ectoderme dorsal ao tubo neural e na região do broto da asa, positiva em relação ao ácido hialurônico, sendo sua imagem negativa gerada por digestão por hialuronidase.

O ácido hialurônico pode atrair as células do somito que irão migrar para outras áreas. Na matriz extracelular da notocorda por exemplo, pode agir como estímulo para atrair as células mesenquimais do esclerótomo que colonizam este local para formar as vértebras. Na região do broto da asa pode atrair as células do miótomo que vão originar os músculos e na região abaixo da ectoderme pode atrair as células do dermatomo que irão formar a derme da pele. Por outro lado este ácido pode repelir células de crista neural que migram entre os somitos e o tubo neural, já que estas sempre evitam a notocorda. O padrão de distribuição de ácido hialurônico na matriz extracelular da notocorda entre as aves Leghorn branca e Sedosa japonesa branca é o mesmo. No somito anterior de embriões da raça Leghorn branca no estágio 28, coincidindo com o agrupamento de células observado na descrição morfológica, a coloração pelo Alcian Blue permanece forte nas lamina tratadas com Hialuronidase. Este resultado sugere que outras moléculas presentes com afinidade ao Alcian Blue, que não o ácido hialurônico, podem desenvolver uma barreira química para as células de crista neural precursoras de melanócitos.

6. CONCLUSÕES

- As células de crista neural precursoras de melanócitos que estão migrando em estágios mais tardios do desenvolvimento em embriões de aves da raça Leghorn podem ser impedidas de colonizar regiões ventrais por uma compactação de células entre o somito e o tubo neural que age como uma barreira de caráter físico e/ou químico.
- A distribuição do ácido hialurônico possui o mesmo padrão nas raças Sedosa japonesa e Leghorn nos somitos anteriores. O ácido hialurônico pode possuir um papel atrativo para as células do somito, estimulando-as a colonizar outras áreas e por outro lado pode repelir as células de crista neural, já que estas evitam as regiões onde esta glicosaminoglicana está presente.
- Os somitos posteriores de embriões de Leghorn branca no estágio 28 tiveram colorações intensas com o Alcian Blue, mesmo quando tratados com Hialuronidase. Estas colorações coincidem com o agrupamento de células encontrado na descrição morfológica sugerindo que outras moléculas com afinidade ao Alcian Blue possam desenvolver uma barreira química contra as células de crista neural precursoras de melanócitos que não colonizam esta área nesta raça.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

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.