

FABIANA DE FÁTIMA FERREIRA

**PADRÃO ALTERADO DE MIGRAÇÃO DE MELANOBLASTOS EM
EMBRIÕES DE GALINHAS SEDOSA JAPONESA DETECTADO COM
CORANTE LIPOFÍLICO FLUORESCENTE**

Monografia apresentada à disciplina
Estágio EM- Biologia Celular como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel, Curso de Ciências Biológicas ,
Departamento de Biologia Celular,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADORA: Prf^a Dr^a Cloris Ditzel Faraco

**CURITIBA
2000**

DEDICO ESTE TRABALHO

*À Deus, fonte de luz, força
e inspiração*

*À meus pais José Nadir e Marilene
que com seus ensinamentos e apoio,
contribuíram para que eu chegasse
até aqui*

*À tia Irene que com sua sabedoria
e inteligência, sempre
me incentivou a continuar*

AGRADEÇO...

*Ao pessoal do laboratório de Embriologia e do departamento de Biologia Celular pelo
companheirismo e colaboração*

*Aos amigos que me incentivaram e apoiaram nos momentos mais difíceis, seja durante
os 5 anos do curso de Biologia ou durante a elaboração deste trabalho*

*E especialmente à professora Cloris pela , amizade, compreensão , paciência e
dedicação com que tem me orientado todos estes anos*

“Buscai e achareis.....”

Jesus Cristo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII e VIII
RESUMO.....	IX
1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	10
1 - A crista neural.....	10
1.2 - As vias migratórias da crista neural em embriões de aves.....	12
1.3 - Propostas para explicar a distribuição e diferenciação das células de crista neural.....	13
1.4 - As aves Sedosa japonesa.....	15
2 - OBJETIVO	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - Preparo dos ovos.....	18
3.2 - Microinjeções de corante DiI em solução na luz do tubo neural.....	18
3.3 - Fixação dos embriões.....	19
3.4 - Criomicrotomia	19
4 - RESULTADOS	20
4.1 - Abertura de janelas.....	20
4.2 - Cuidados especiais no momento da injeção.....	20
4.3 - O corante DiI.....	20
4.4 - Os embriões injetados.....	21
4.5 - Determinação do estágio apropriado para acompanhamento da saída de células do tubo neural.....	21

4.6 – Presença de células marcadas na ectoderme em ambas as raças estudadas.....	21
4.7 – Padrão de migração em Sedosa japonesa.....	21
4.8 – Ausência de migração ventral em aves Leghorn.....	22
4.9 – Padrão diferenciado de fluorescência nos filmes de 1600 e 800 ASA.....	22
5 – DISCUSSÃO.....	39
6 – CONCLUSÃO.....	42
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fotografia de aves adultas da raça Sedosa japonesa branca e perdiz).....	24
FIGURA 2 – Fotografia de aves adultas da raça Leghorn.....	24
FIGURA 3 – Fotografia de embrião da raça Sedosa japonesa de 18 dias seccionado ventralmente	26
FIGURA 4 – Fotografia de embrião de 18 dias da raça Leghorn seccionado ventralmente	26
FIGURA 5 – Fotografia mostrando procedimento de abertura das “janelas” nos ovos	28
FIGURA 6 – Fotografia de embrião de ave no estágio 22 mostrando o ponto de injeção do corante.....	30
FIGURA 7 – Fotomicrografia mostrando embrião de ave Estágio 22 em corte transversal (coloração com H.E.).....	30
FIGURA 8 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa no estágio 28, em corte transversal, mostrando via dorsolateral sem células marcadas.....	32
FIGURA 9 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa no estágio 25, em corte transversal, mostrando migração de células pela via dorsolateral.....	32
FIGURA 10 - Fotomicrografia de embrião da raça Leghorn (est. 28)em corte transversal , mostrando a presença de células marcadas na ectoderme e ausência destas em regiões ventrais.....	34
FIGURA 11 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa (est.28), em corte transversal, mostrando células marcadas em regiões ventrais.....	34

FIGURA 12 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa (est.28), em corte transversal ,mostrando células marcadas migrando pelas vias ventral e dorsolateral.....36

FIGURA 13 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa (est. 26) , mostrando células marcadas na via dorsolateral desviando-se para regiões ventrais.....36

FIGURA 14 – Fotomicrografia de embrião da raça Sedosa japonesa (est.28), em corte transversal, mostrando células marcadas em regiões ventrais.....38

FIGURA 15 – Fotomicrografia de embrião da raça Leghorn (est.28), em corte transversal, mostrando ausência de células marcadas em regiões ventrais.....38

RESUMO

A crista neural é um grupo de células que se origina na região mais dorsal do tubo neural após o fechamento deste. Esta população de células é um interessante objeto de estudo pela sua capacidade de originar diversos tipos celulares, desde neurônios até melanócitos. As aves Sedosa japonesa apresentam intensa pigmentação em suas membranas viscerais, o que não ocorre em outras raças em que melanócitos se restringem a derme e epiderme. Utilizando técnicas de marcação com corante fluorescente DiI, injetado na luz do tubo neural, tornou-se possível a marcação de células de crista neural pré-migratórias e determinação do padrão migratório e localização final de melanoblastos, para comparação do padrão de migração destas células em embriões das raças Sedosa japonesa e Leghorn. Analisando cortes de embriões das duas raças estudadas verificou-se que nos estágios posteriores ao 18-20 cessa o destacamento de células de crista do tubo neural. Observou-se a presença de células marcadas migrando pela via dorsolateral rumo à região da ectoderme em ambas as raças, em embriões injetados nos estágios 18-20. Em Sedosa também observou-se uma migração ventral de células marcadas que posicionaram-se próximas à aorta dorsal, mesentério e ductos mesonéfricos. Os resultados obtidos sugerem que a migração ventral de precursores de melanócitos pode ser a causa da intensa pigmentação nas membranas internas e viscerais de galinhas Sedosa japonesa.

1-INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1-A crista neural

A crista neural é uma estrutura embriológica transitória dos vertebrados , formada pela transformação epitélio-mesenquimal de células derivadas do tubo neural dorsal, durante a neurulação (Duband et al, 1995). Este conjunto celular surge pelo destacamento de células do epitélio neural , da região mais dorsal do tubo, após o fechamento deste. Desta área as células migram no sentido rostro-caudal e ântero-posterior para diversas regiões do corpo do embrião dando origem a vários tipos celulares desde neurônios até células pigmentares (Le Douarin,1982) , sendo portanto por sua multipotencialidade e por apresentar diferentes vias de migração um modelo rico para estudos de migração e diferenciação celular (Le Douarin e Teillet,1974 rev em Le Douarin 1982; Le Douarin e Ziller,1993). De acordo com Erickson,1993 a segregação das células de crista neural da superfície dorsal do tubo neural, sua migração e diferenciação é um dos mais complexos eventos migratórios durante o desenvolvimento, sendo superado apenas pelo estabelecimento e destinação das células germinativas primordiais. Algumas propostas para explicar o destacamento das células de crista neural do tubo e início da migração sugerem:1) **Liberção das células de crista neural do tubo neural devido a rupturas da lâmina basal em torno do tubo** de acordo com observações como a presença de uma lâmina basal incompleta acima do tubo no local de onde as células iniciam o desligamento. Esta avaria na lâmina poderia ser causada pelas próprias células de crista pela ação de proteinases, ou pela ausência ou pequena produção de material de matriz por estas células ocasionando da mesma forma uma lâmina basal incompleta. Porém a existência de uma lâmina basal incompleta é pré-requisito para a emigração mas não a causa da separação das células de crista do tubo neural; 2) **Estabelecimento de um substrato apropriado onde as células de crista neural possam se mover.** Para migrar no espaço acima do tubo neural , as células de crista necessitam de um substrato onde migrar e receptores celulares com os quais possam interagir e aderir ao substrato ou matriz extra celular. Mudanças nos

componentes de matriz parecem não ser as desencadeadoras da emigração pois muitos componentes de matriz com os quais as células de crista interagem já estão presentes muito antes da emigração, como por exemplo: **fibronectina, laminina, hialuronato e proteoglicanas sulfatadas**. Então, uma matriz extra celular adequada é uma pré-condição favorável para a migração, mas não o elemento desencadeador dela em embriões de aves (Erickson, 1993). **3) Geração de motilidade:** Em diversos momentos durante o desenvolvimento, as células são imóveis até certo momento, quando então elas repentinamente começam a migrar. O fator que desencadeia a motilidade celular é desconhecido, mas uma classe de moléculas conhecidas como **Fatores de Estimulação da Motilidade** podem desempenhar um importante papel na coordenação e regulação dos movimentos morfogênicos (Erickson, 1993). **4) Mudança na adesividade das células de crista neural:** Mudança na adesividade entre presuntivas células de crista neural e entre estas e as células do epitélio neural parecem preceder e conseqüentemente iniciar a emigração. Diminuição na adesividade célula-célula ou das junções célula-célula são importantes eventos, e diversos estudos sugerem que a diminuição da adesão acompanha o destacamento das células de crista neural. Moléculas de adesão como A-CAM (N-caderina) e N-CAM aparecem reduzidos em células pré-migratórias, o que poderia desencadear a migração. Os mecanismos que poderiam levar a essa diminuição nas moléculas de adesão poderiam ser:

a) Regulação negativa das moléculas de adesão, b) Digestão das moléculas de adesão por proteases e c) modificações bioquímicas nos ligantes de adesão que poderiam mudar a afinidade, como por exemplo a fosforilação. Outras formas de destacamento das células de crista sem a perda de moléculas de adesão poderiam ser: 1) A geração de uma força tracional suficiente para puxar as células de crista para fora do complexo juncional (não existem evidências diretas que comprovem esta hipótese) e 2) O plano de clivagem formado durante a citocinese poderia separar as células filhas das junções apicais. Especificamente, se o fuso mitótico for orientado perpendicular à superfície do epitélio, o plano de clivagem seria de tal forma que uma das células filhas estaria presa ao lúmen via

junções aderentes ao passo que a outra célula filha estaria livre para migrar (Erickson, 1993).

1.2-As vias migratórias da crista neural em embriões de aves

A região do tronco de embriões de aves , as células de crista neural migram por dois caminhos principais em diferentes intervalos de tempo. Nesta região as primeiras células a desligarem-se do tubo neural por volta do estágio 12-13 migram pela via chamada **ventral** , por situar-se entre o somito e o tubo neural e atingir regiões mais ventrais . Esta população de células diferencia-se em neurônios sensoriais e do Sistema Nervoso Simpático , células da medula adrenal e células de Schwann (Serbedzija et al ,1989). Ao migrarem ventralmente estas células alcançam a aorta dorsal e começam a se agrupar formando gânglios simpáticos e depois os da raiz dorsal. Podem também se agregar na região do rim para formar a medula adrenal ou se espalhar ao longo da raiz ventral de fibras motoras e se diferenciar em células da glia (Erickson,1993). Outra rota tomada pelas células de crista neural é a **via dorsolateral** situada entre a ectoderme e o somito. Esta migração na região do tronco começa por volta do estágio 19 do desenvolvimento embrionário da ave e só se inicia após ter cessado a migração pela rota ventral. As células que seguem esta via são precursores de melanócitos que migram pela periferia do embrião para posteriormente entrarem na ectoderme através de perfurações da lâmina basal feitos por eles mesmos . Na ectoderme colonizarão pele e folículos e se diferenciarão em melanócitos (Erickson,1993). Estudos feitos por Serbedzija e colaboradores (1989) com microinjeções de corante fluorescente (DiI) em solução na luz do tubo neural , permitiram maior detalhamento das vias percorridas pelas células da crista neural após desligarem-se do tubo bem como seu destino final. O corante livre na luz do tubo pode facilmente marcar as células pré-migratórias , visto que está em pleno contato com as mesmas. Este corante é muito útil para estudos de migração celular pois sendo lipofílico intercala-se nas membranas celulares de forma estável sem deixar resíduos. Uma importante questão a ser

levantada no estudo de células de crista neural é a questão de sua potencialidade para originar diferentes fenótipos .

1.3-Propostas para explicar a distribuição e diferenciação das células de crista neural

Para explicar a distribuição e diferenciação das células de crista neural ao nível do tronco de aves , dois modelos vem sendo discutidos: **1) O ambiente como determinante:** Este modelo prediz que um conjunto de células pluripotentes originada da crista neural migra ao acaso se dispersando de acordo com as condições do meio seguindo por caminhos favoráveis e finalmente diferenciando-se de acordo com o meio onde estiverem (Le Douarin e Ziller, 1993). **2) O fenótipo celular é determinante:** Este modelo sugere que um grupo específico de células advindas da crista neural, os precursores dos melanócitos, já está especificado antes mesmo de iniciar sua migração e portanto , já aptas a escolher ou explorar vias específicas (Erickson e Goins, 1995). Kitamura e colaboradores (1992) demonstraram que algumas células de crista neural expressam epítipo MEBL (específico de células de linhagem melanocítica) antes de entrarem na via dorsolateral. Reedy e colaboradores (1998 a) usando soro Smyth-line como marcador de melanoblastos em aves e anticorpo HNK-1 que é marcador de células de crista neural, demonstraram que a subpopulação de células de crista neural que se diferenciara em melanócitos já , apresenta características de melanoblastos, antes de serem expostos ou de entrarem na via dorsolateral. Através de experimentos realizados por esta equipe com cultura de células verificou-se que célula de crista neural que migram pela via ventral, quando isoladas e cultivadas em condições ideais para melanogênese , não são capazes de diferenciar-se em melanócitos. Por outro lado quando células de crista neural que migram pela via dorsolateral foram isoladas e cultivadas sob mesmas condições observou-se um grande aumento no número destas células (melanoblastos). Existe portanto uma heterogeneidade nas bases fenotípicas das células da crista neural que se desligam do tubo neural em diferentes momentos , e sugere-se que estas diferenças são a causa da escolha de

diferentes caminhos em diferentes estágios na morfogênese da crista neural (Reedy et al 1998 a). Outras questões levantadas por Reedy e colaboradores (1998 a) são que: a) Os melanoblastos migram preferencialmente pela via dorsolateral, mas não são absolutamente proibidos de entrar na via ventral; b) A especificação em melanoblastos é pré-requisito para entrar na via dorsolateral; c) normalmente não existem melanoblastos na via ventral e d) o atraso na migração dorsolateral em relação à migração ventral é devida a um atraso na emigração das células de crista neural melanogênicas a partir do tubo neural. Erickson e Goins (1995) ao implantar células de linhagem melanocítica em embriões mais jovens onde ocorria apenas a migração ventral, verificaram que as células implantadas migraram dorsolateralmente, demonstrando que estas células já estavam especificadas antes de entrar nesta via e portanto capacitadas a explorá-la. Estas evidências todas reforçam portanto o modelo em que o fenótipo das células parece dirigir seu comportamento e destino no embrião. O fato de somente os melanoblastos migrarem dorsolateralmente pode se dever a eles serem as únicas células sensíveis a fatores secretados pelo dermomiótomo (somito) como sugerido por Wehrle-Haller e Weston (1995) ou por os melanoblastos serem insensíveis à ação de moléculas presentes na via dorsolateral que impedem outras células de crista neural de entrarem neste espaço. Oakley e colaboradores (1994) observaram que dois marcadores transitórios poderiam inibir temporariamente as células de crista neural de entrarem na via dorsolateral em aves: moléculas detectadas pela lectina aglutinina de amendoim (PNA) e condroitin-6-sulfato. Verificaram que ambos tem suas quantidades reduzidas na via dorsolateral nos estágios em que as células de crista neural iniciam sua migração por ela. Estas substâncias estariam retidas na região final do dermomiótomo (somito) sendo a causa de as células evitarem esta via anteriormente. Em embriões de ave, as células de crista neural que migram pela via ventral ao nível **vagal** (somito 1 a 7) e **sacral** (somito 28 em diante) migram para dentro do intestino e se diferenciam em neurônios e células da glia do Sistema Nervoso Entérico. Já as células de crista neural que migram pela via ventral ao **nível cervical e torácico**, param sua migração ao nível do mesentério dorsal e não entram

no intestino (Erickson e Goins,2000). Erickson e Goins fazendo transplantes de células do nível sacral para o nível torácico e vice-versa, verificaram que as células de crista neural que migram pela via ventral tem comportamento de acordo com seu novo ambiente , e não de acordo com seu local de origem. Estas pesquisadoras verificaram que o ambiente ao nível sacral permite que as células de crista neural de outros níveis axiais entrem no mesentério e mesênquima do intestino. Ao menos 2 condições ambientais ao nível sacral aumentariam a migração ventral: 1) As células de crista neural teriam preferência pela via ventral à médio-lateral (através do somito) e conseqüentemente chegariam próximo ao mesênquima intestinal mais cedo por seguirem rotas mais direta. 2) A endoderme do intestino é mais dorsalmente situada ao nível sacral do que ao nível torácico, e portanto as células de crista neural sacral têm um caminho mais direto para o intestino do que as células do nível torácico que ao atingirem áreas mais ventrais teriam uma barreira impedindo-as de migrarem para a aorta dorsal e para dentro do mesentério de onde alcançariam o intestino (Erickson e Goins,2000).

1.4- As aves Sedosa japonesa

As aves da raça Sedosa japonesa apresentam um padrão alterado de pigmentação , pois as células pigmentares ocupam a maioria dos tecidos conjuntivos conferindo um aspecto preto-azulado a alguns órgãos. Além da pigmentação da pele (derme e epiderme), normalmente encontrada em outras aves, as Sedosas japonesas adultas apresentam células do pigmento nas membranas viscerais de diversos órgãos como: esôfago, traquéia, língua, vasos sanguíneos, meninges, peritônio e mesentérios. Outros órgãos como: fígado, baço e coração não são pigmentados (Vaz,1999). Nesta ave hiperpigmentada a migração dos melanócitos além de seguir a via dorsolateral parece ocorrer também pela via ventral. Reedy e colaboradores (1998 b) propõem que a migração ventral em Sedosa japonesa possa ocorrer por ação de um ambiente no embrião que promova a maior motilidade e rápida dispersão das células do pigmento e/ou pela presença de fatores sobrevivência específicos para melanoblastos. Estes autores sugerem que substâncias quimioatrativas

na via ventral permitam a ocorrência de grande número de melanoblastos ventrais e que a migração ventral dos melanoblastos poderia ser a causa da hiperpigmentação das membranas viscerais em galinhas Sedosa.

2 - OBJETIVO

Com o uso de corantes fluorescentes , determinar através da comparação entre as raças Sedosa japonesa (que apresenta pigmentação nas membranas viscerais) e Leghorn (que não apresenta tal pigmentação) se existem diferenças no padrão de migração dos melanoblastos que expliquem esta diferença fenotípica.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Preparo dos ovos

Ovos embrionados de galinhas Sedosa japonesa (branca e perdiz) (Fig. 1) e Leghorn (branca e perdiz) (Fig. 2), provenientes da Fazenda Experimental da UFPR e Biotério do Setor de Ciências Biológicas UFPR, previamente limpos e marcados foram incubados horizontalmente a 38°C até atingirem os estágios desejados (Hamburger e Hamilton,1951) para microinjeções . Através de uma perfuração no lado mais largo do ovo retirou-se um pouco da clara , com o auxílio de uma seringa limpa e esterilizada, com o objetivo de diminuir o volume dentro do ovo e afastar o embrião da casca. Um pedaço de fita adesiva vedou o orifício formado pela introdução da agulha e outro foi colocado na superfície superior do ovo (sobre o embrião) para facilitar o recorte de uma “janela” na casca (Fig.5), através da qual se pudesse acessar o embrião.

3.2-Microinjeção do corante DiI em solução na luz do tubo neural

Esta técnica foi utilizada para a marcar células da crista neural de linhagem melanocítica antes destas deixarem o tubo neural. As microinjeções do corante lipofílico fluorescente DiI (perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI, Molecular Probes, USA) em solução 0,5% em etanol 100% diluída em sacarose 0,3 Molar foram realizadas na luz do tubo neural (Fig.7) de embriões das raças Sedosa japonesa e Leghorn em estágios 18-22 do desenvolvimento embrionário(Hamburger e Hamilton,1951) O corante DiI por suas propriedades lipofílicas insere-se de forma estável nas membranas celulares, sem perder-se durante os movimentos migratórios. As soluções corante foram devidamente centrifugadas antes do uso para a remoção dos cristais. As injeções de DiI foram feitas com microagulhas obtidas pela extensão sob chama de tubos capilares de borossilicato (Sigma). As microagulhas foram preenchidas com corante por capilaridade , pela parte posterior , e introduzidos obliquamente através da membrana vitelínica e da ectoderme até o tubo neural, onde o corante foi liberado por pulso de

pressão. A introdução da microagulha foi feita com o corante sendo levemente aspirado para evitar o extravasamento antes de atingir o tubo, e a retirada enquanto ainda estava sendo exercida uma ligeira pressão, impedindo assim, o refluxo do corante. O ponto de injeção do corante foi a área logo acima do broto da perna (Fig.6) pois, estando em porção muito abaixo do broto da asa que é a área de interesse, os resíduos de corante fora do tubo e a lesão local deixados pela injeção ficam distantes da área de estudo. Os ovos depois de selados com fita adesiva retornaram à incubadeira até atingirem os estágios 24-28.

3.3-Fixação dos embriões

Após o período de reincubação, os embriões foram retirados dos ovos, imediatamente colocados em PBS 1x e observados sob lupa para determinar o estágio embrionário, retirada das membranas amniótica e vitelínica e recorte da região do tronco (sendo cortadas com uma lâmina de gilete a área acima do broto da asa e a porção caudal). A fixação foi feita em paraformaldeído 4% em solução tamponada com fosfato por uma hora e meia.

3.4-Criomicrotomia

Preparando os embriões para a microtomia, estes foram lavados várias vezes em PBS, embebidos em sacarose 5% em PBS por uma hora e meia, e em sacarose 15% em PBS durante uma noite. A embebição foi feita em meio apropriado (OCT) Tissue Freezing Medium, durante 3 horas à temperatura ambiente. Para inclusão, os embriões foram colocados em moldes plásticos com OCT novo (à temperatura ambiente) e o congelamento em nitrogênio líquido foi feito rapidamente. Os blocos mantidos em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas, foram cortados em criostato e os cortes de 16 μm coletados em lâminas previamente recobertas com gelatina. Os cortes obtidos foram observados em lâmina seca sem lamínula, no microscópio de epifluorescência com filtro de rodamina para DiI e os resultados fotografados com filme de 1600 e 800 ASA.

4 - RESULTADOS

4.1-Abertura de janelas

A técnica de abertura de “janelas” (Fig. 5) nos ovos representa estratégia eficaz para análise dos processos celulares em embriões vivos. Através de uma pequena abertura na casca tornou-se possível o acesso , manipulação e injeção do corante DiI na luz do tubo neural dos embriões , com a sobrevivência de uma grande porcentagem (80%) destes, que prosseguiram seu desenvolvimento normalmente até o período necessário para análise (um a dois dias após a manipulação).

4.2-Cuidados especiais no momento da injeção

Alguns cuidados especiais foram essenciais para o sucesso das injeções como: recorte das membranas externas que envolvem o embrião ; assepsia dos materiais , ovos e local utilizados para as injeções; manipulação rápida evitando a queda de temperatura no ambiente interno do ovo (o que pode levar à morte do embrião) e precisão no momento da injeção para liberar o corante no ponto exato , evitando a marcação de outras estruturas além do tubo neural ou extravazamento em regiões próximas (o que poderia causar a marcação em células outras que não as de crista neural)

4.3- O corante DiI

o corante DiI foi um bom marcador neste estudo de células migratórias , pois ao ser injetado na luz do tubo neural entrou em contato com as células pré-migratórias por tempo suficiente para ser incorporado às suas membranas plasmáticas. Devido ao seu caráter lipossolúvel integrou-se de forma estável às membranas plasmáticas , sem ser perdido durante a migração celular.

4.4- Os embriões injetados

Cerca de 80 embriões foram injetados e processados para criomicrotomia, sendo que destes 30% apresentaram marcação adequada e portanto foram utilizados para análise. Considerou-se inadequada a injeção em que se percebeu indício de vazamento do corante, ruptura de estruturas ou presença de corante em estruturas que não o tubo neural, o que pode significar injeção muito profunda.

4.5- Determinação do estágio apropriado para acompanhamento da saída de células do tubo neural

Foram realizadas injeções de DiI em solução na luz do tubo neural de embriões das raças Sedosa japonesa (branca e perdiz) e Leghorn (branca e perdiz) nos estágios 21-22 que foram fixados nos estágios 26-28. Nos cortes obtidos observou-se a presença de poucas células migrando pela via dorsolateral em ambas as raças e quase nenhuma célula na região imediatamente dorsal ao tubo neural, revelando que nestes estágios de desenvolvimento dessas aves a saída de células do tubo neural praticamente cessou (Fig.8). Os estágios 18-20 de desenvolvimento embrionário nas aves Sedosa japonesa e Leghorn, apresentaram-se como ideais para a injeção do corante no tubo neural e acompanhamento da migração dos melanoblastos, tendo em vista a presença de muitas células marcadas em região imediatamente dorsal ao tubo neural e muitas células iniciando a migração pela via dorsolateral (Fig.9).

4.6- Presença de células marcadas na ectoderme em ambas as raças estudadas

Pôde-se verificar a presença de células marcadas próximas ao tubo neural e tomando a via dorsolateral rumo à regiões próximas à ectoderme em ambas as raças (Fig.10 e Fig.12).

4.7- Padrão de migração em Sedosa japonesa

Em embriões da raça Sedosa japonesa injetados com corante DiI nos estágios 18-20 e fixados nos estágios 24-28, observou-se células marcadas migrando pela via dorsolateral

como nas outras raças e também pela via ventral , posicionando-se próximas à regiões ventrais do embrião como a aorta dorsal e região dos ductos mesonéfricos (Fig.11, Fig.12 e Fig.14). Ainda nos embriões de Sedosa japonesa de mesmo estágio observou-se que algumas células que migraram pela via dorsolateral parecem desviar-se rumo às regiões ventrais do embrião (Fig. 13).

4.8- Ausência de migração ventral em Leghorn

Nos embriões de aves Leghorn injetados nos estágios 18-20 e fixados nos estágios 24-28 não foram detectadas células marcadas migrando ou posicionando-se em regiões ventrais do embrião (Fig.10 e 15).

4.9- Padrão diferenciado de fluorescência nos filmes de 1600 e 800 ASA

Cortes fotografados com filme de 1600 ASA apresentaram padrão de coloração das células marcadas em vermelho fluorescente e o fundo(ambiente) escuro. (Figuras 1 a 13). Cortes fotografados com filme 800 ASA ,devido à menor sensibilidade e consequente necessidade de menor tempo de exposição, apresentaram células marcadas com coloração amarelo intenso e fundo (ambiente) avermelhado (fotos14 e 15).

FIGURA 1 – Aves adultas da raça Sedosa japonesa (branca e perdiz)

FIGURA 2 – Aves adultas da raça Leghorn



FIGURA 1



FIGURA 2

FIGURA 3 – Embrião da raça Sedosa japonesa (perdiz) de 18 dias seccionado ventralmente.

Notar: Intensa pigmentação nas membranas viscerais, traquéia e coração.

t- traquéia, **h-** coração, **f-** fígado

FIGURA 4– Embrião da raça Leghorn (perdiz) de 18 dias seccionado ventralmente

Notar: Ausência de pigmentação nas membranas viscerais

t-traquéia, **h-** coração, **f-** fígado

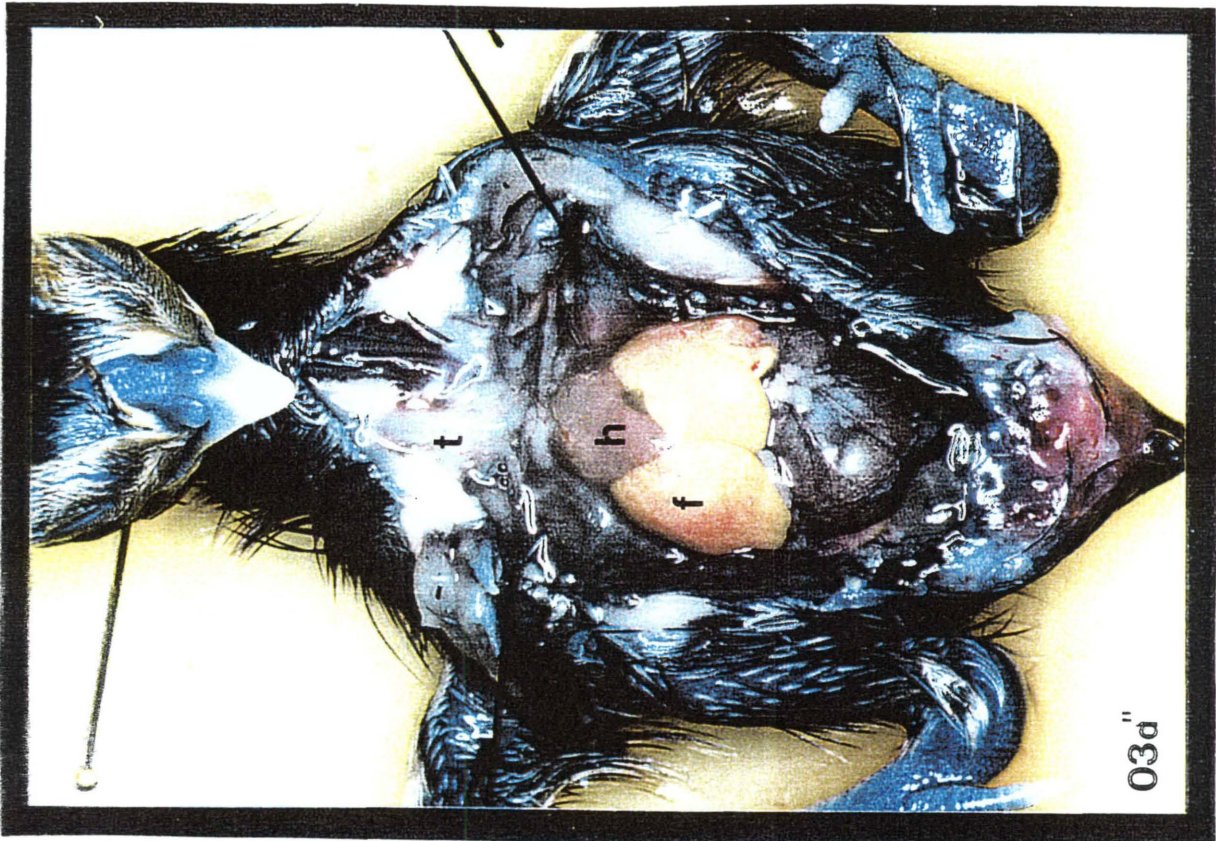


FIGURA 3

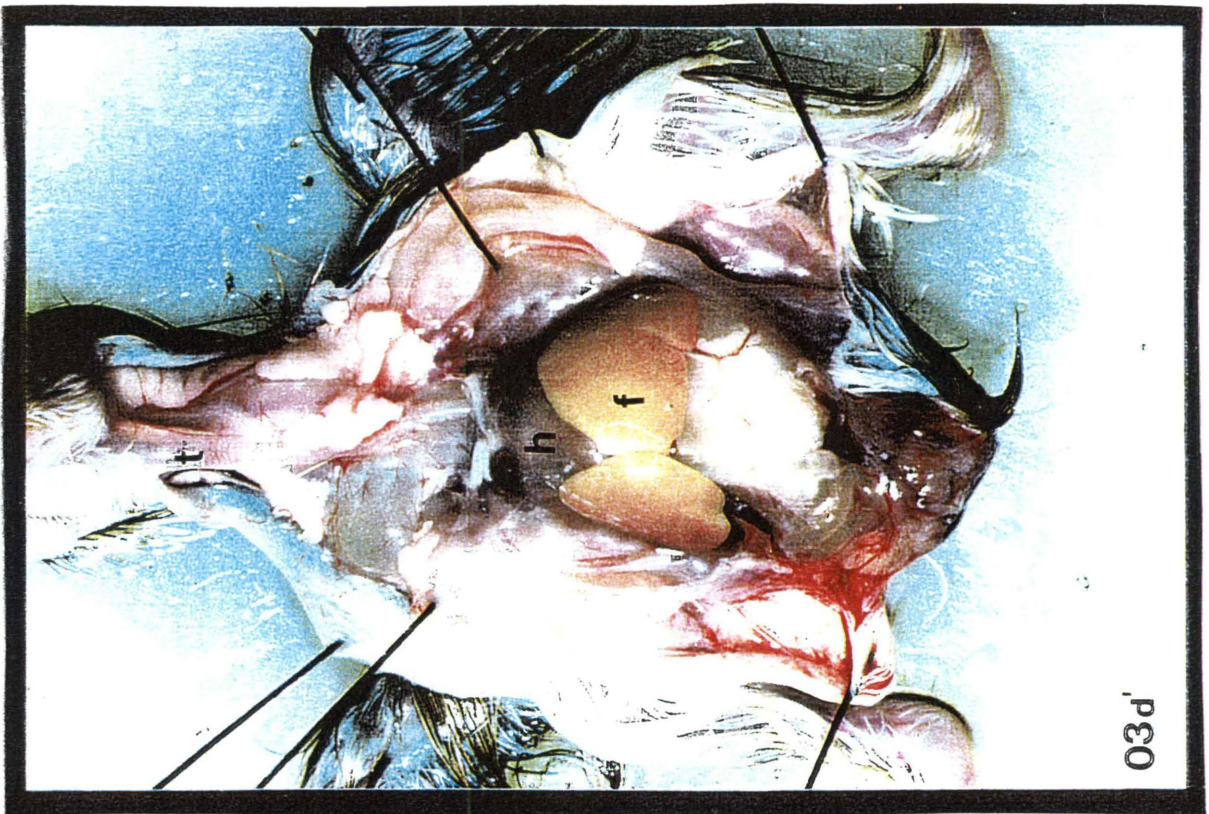


FIGURA 4

Figura 5 – Fotografia mostrando o procedimento de abertura de “janelas” nos ovos

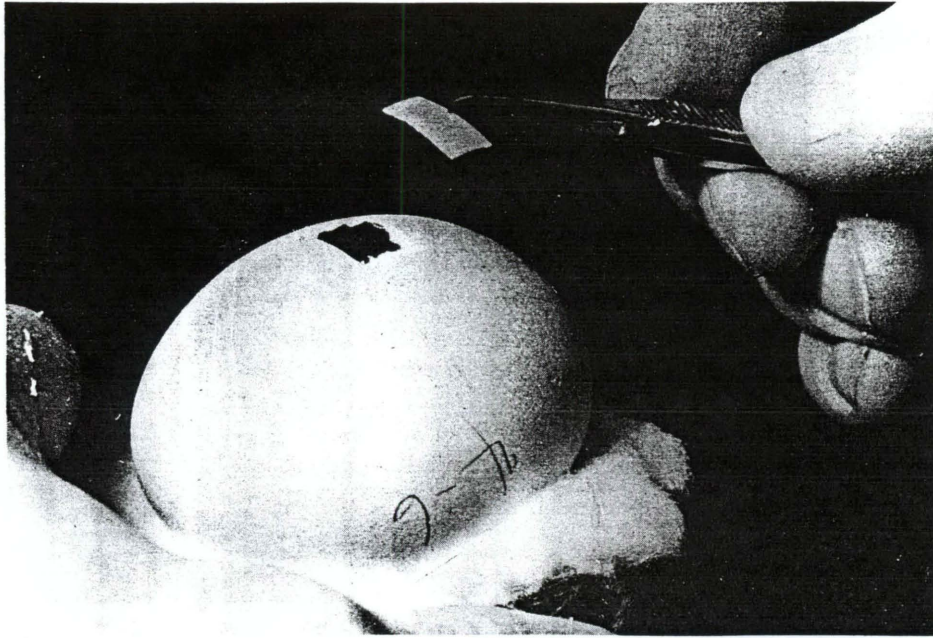


FIGURA 5

FIGURA 6 – Fotografia mostrando embrião de galinha no estágio 22.

Entre barras- Região do tronco

Seta- Indica o ponto de injeção do corante na luz do tubo neural

AS- Broto da asa , **P-** Broto da perna, **H-** coração, **A-** Alantóide

Aumento 25x

FIGURA 7 – Fotomicrografia de embrião de galinha no estágio 22, mostrando área de inserção do corante e localização das vias migratórias.

tn- Tubo neural , **dl-** Via dorsolateral , **n-** notocorda , **ad-** Aorta dorsal

dm- Dermomiótomo(somito), **as-** Broto da asa, **dm-** Ductos mesonéfricos

Seta- Indica a luz do tubo neural, onde se injeta o corante DiI

Coloração: H.E

Aumento 100x

FIGURA 6

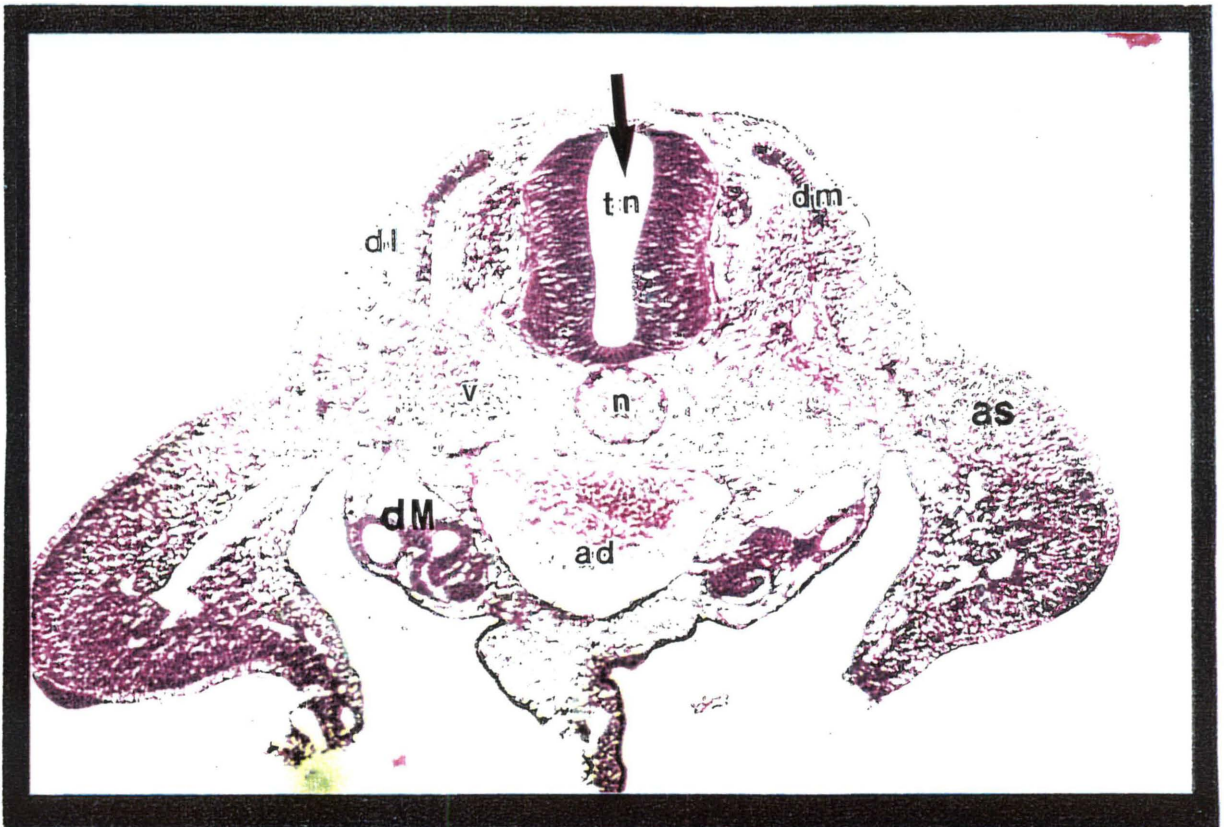
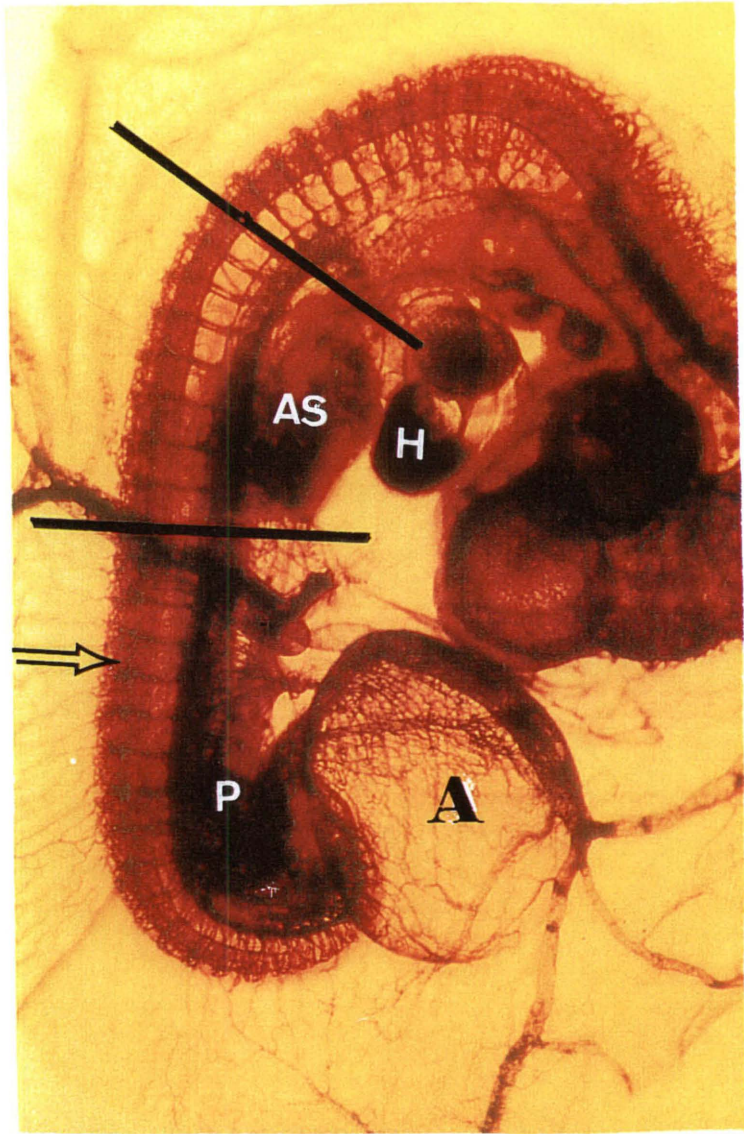


FIGURA 7

FIGURA 8 – Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 22 e fixado no estágio 28.

Notar: Ausência de células marcadas migrando pela via dorsolateral
TN- Tubo neural, **Seta-** Via dorsolateral, **V-**Via ventral, **E-**Ectoderme
Aumento 200x

FIGURA 9 – Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 19 e fixado no estágio 25

Setas- Células marcadas migrando pela via dorsolateral
E-Ectoderme, **TN-**Tubo neural, **DL-**Via dorsolateral
Aumento 400x

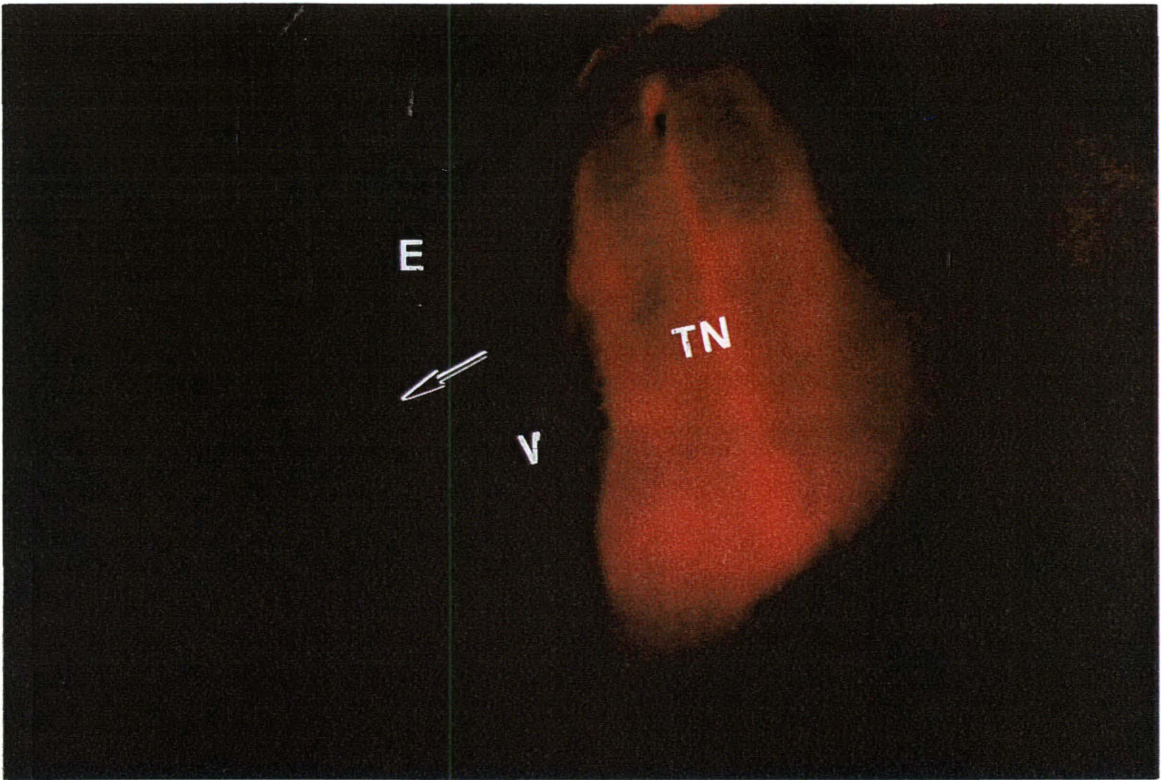


FIGURA 8

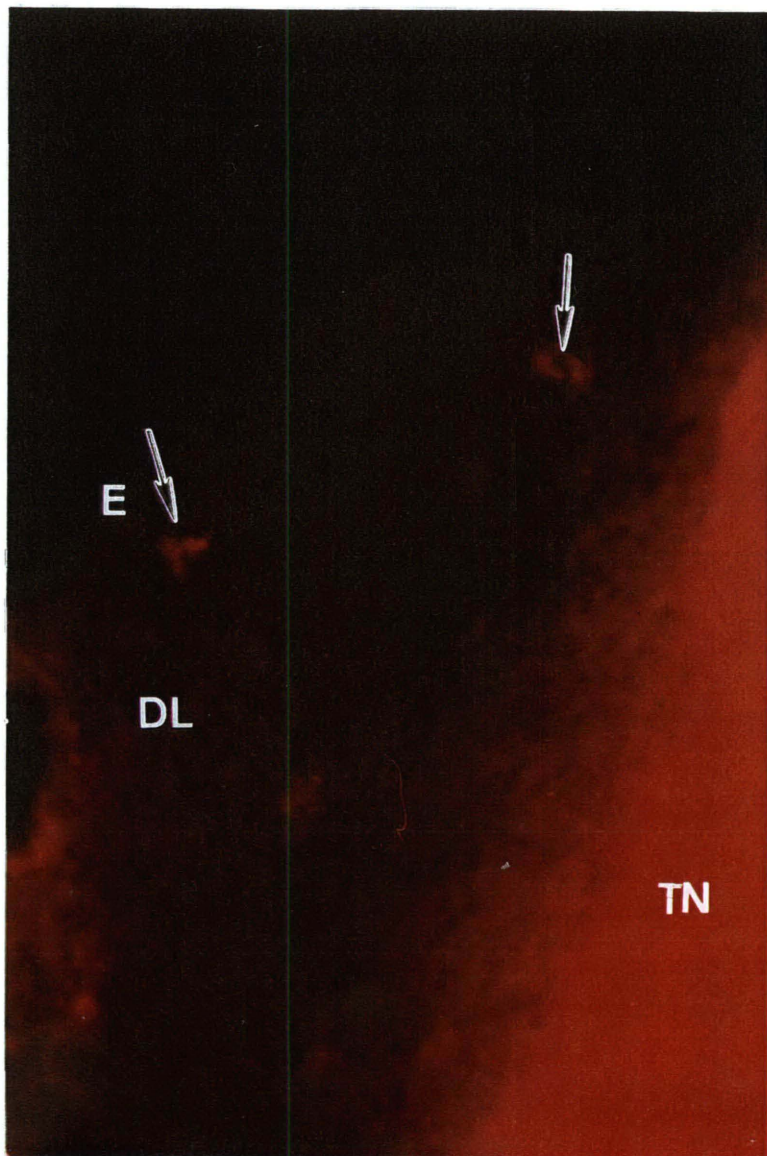


FIGURA 9

FIGURA 10- Corte transversal de embrião da raça Leghorn injetado no estágio 19 e fixado no estágio 28

Notar: Presença de células marcadas somente na região da ectoderme

Setas- Células marcadas, **RV-**Regiões ventrais, **TN-** Tubo neural,

E- Ectoderme

Aumento 400x

FIGURA 11 – Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 19 e fixado no estágio 28

Notar: Presença de células marcadas na região ventral do embrião

Setas- Células marcadas, **RV-**Regiões ventrais, **NA-**Notocorda,

AD-Aorta dorsal

Aumento 400x

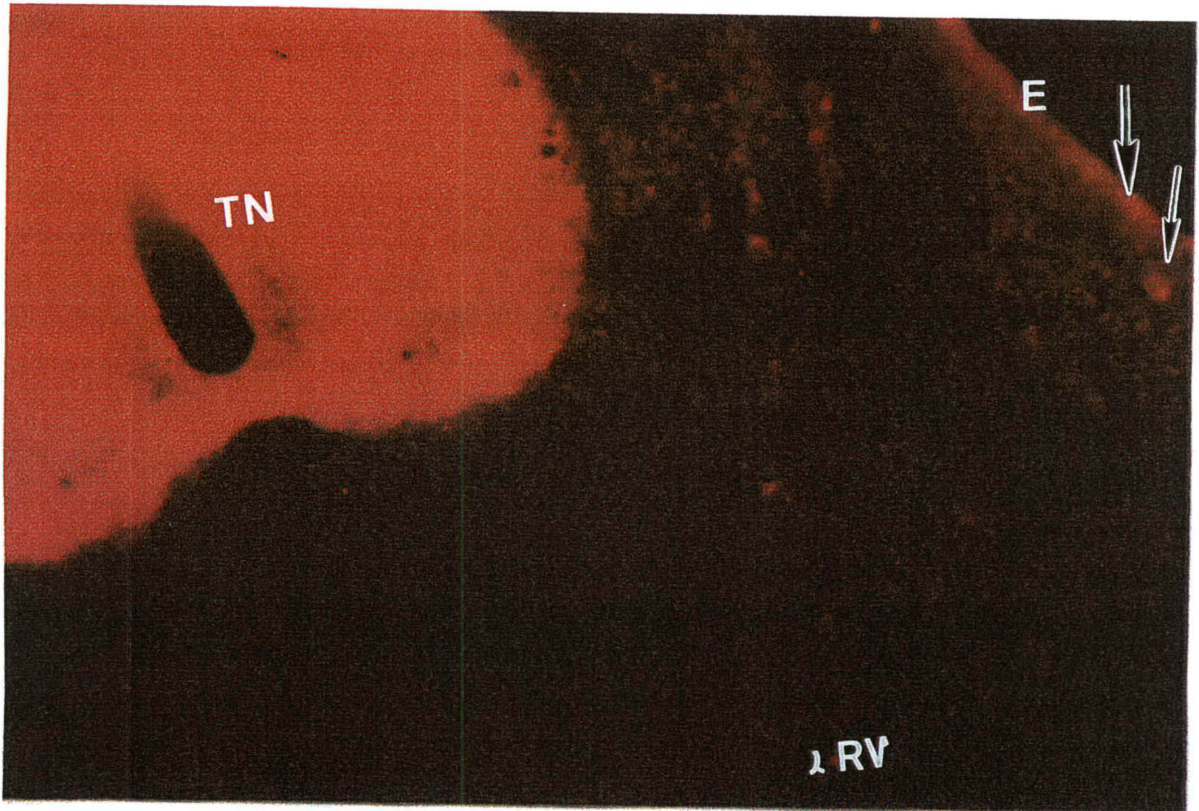


FIGURA 10

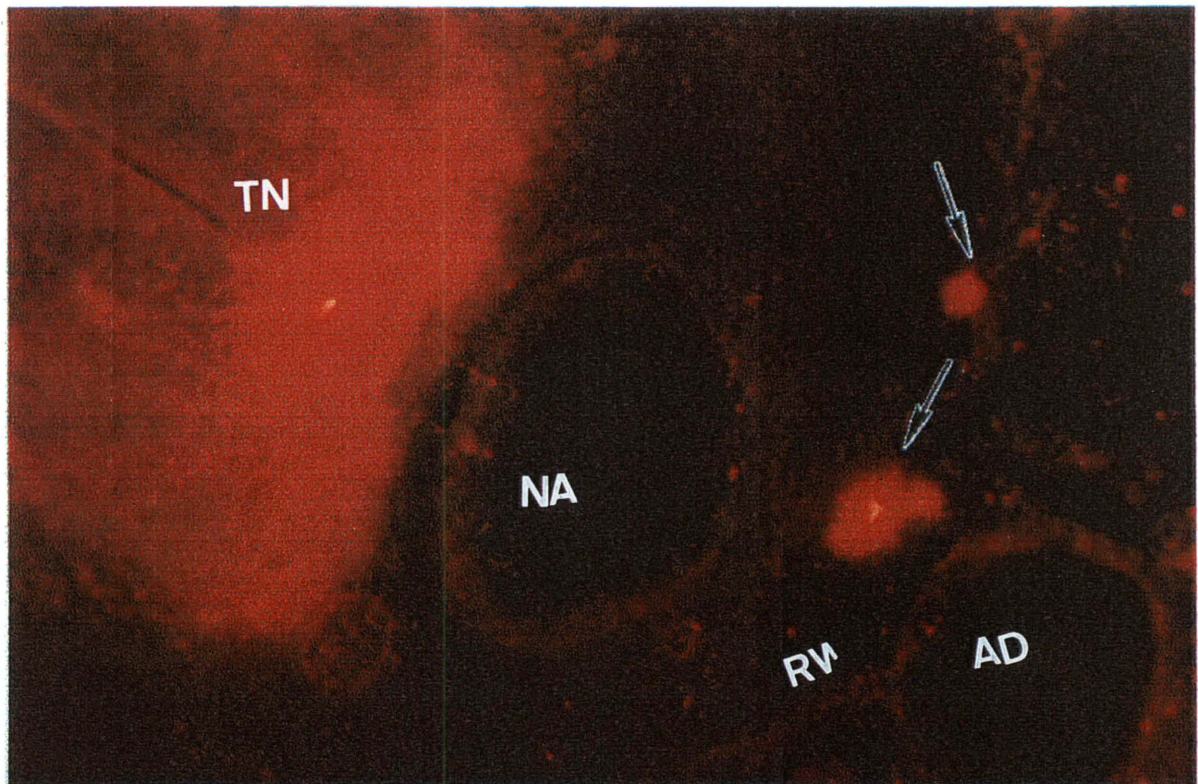


FIGURA 11

FIGURA 12- Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 19 e fixado no estágio 26.

Notar: Presença de células marcadas migrando pela via ventral e rumo às regiões ventrais e células marcadas migrando pela via dorsolateral posicionando-se próximo à ectoderme.

TN- Tubo neural, **DL-** Via dorsolateral, **E-** Ectoderme,

V- Via ventral, **RV-** Regiões ventrais, **Setas-** Células marcadas
Aumento 100x

FIGURA 13 – Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 19 e fixado no estágio 26.

Notar: Células marcadas migrando pela via dorsolateral e desviando-se para regiões mais ventrais

E- Ectoderme, **DL-** Via dorsolateral, **AD-**Aorta dorsal

Setas- Células marcadas, **AS-** Broto da asa

Aumento 400x

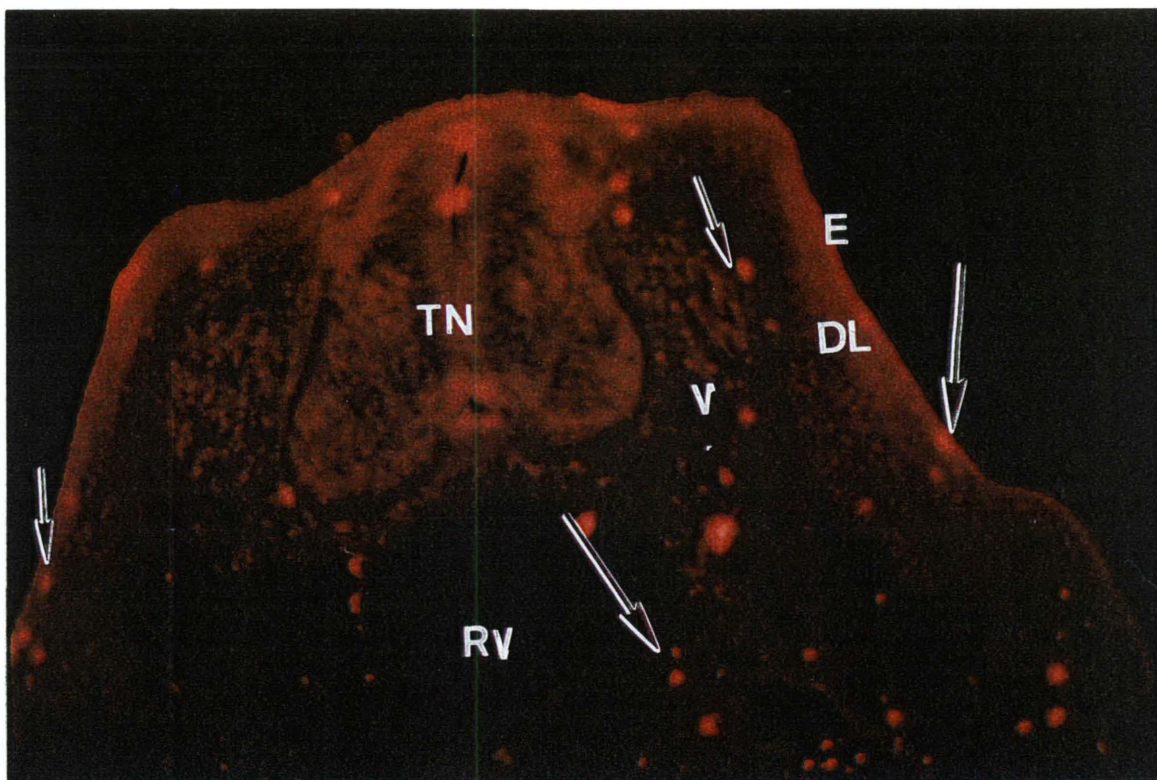


FIGURA 12

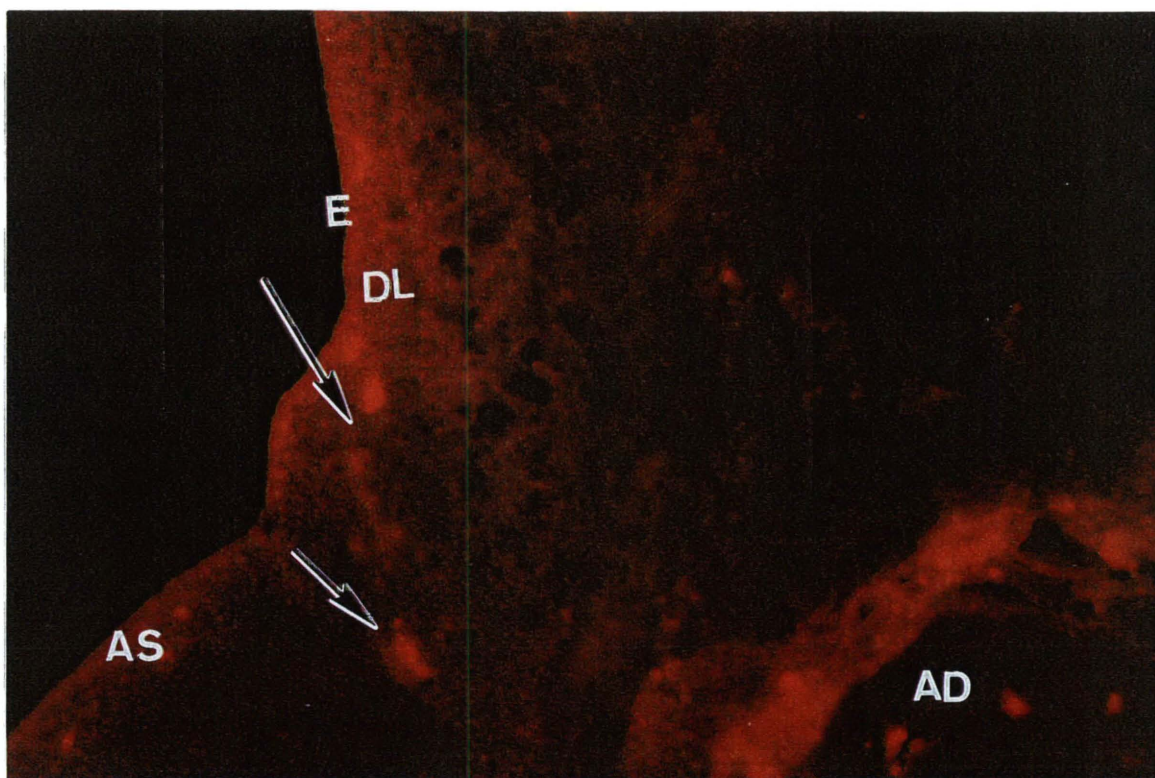


FIGURA 13

FIGURA 14- Corte transversal de embrião da raça Sedosa japonesa injetado no estágio 20 e fixado no estágio 28.

Notar: Presença de células marcadas em regiões ventrais

Setas- Indicam células marcadas

TN- Tubo neural, **N-** Notocorda, **AD-** Aorta dorsal, **AS-** Broto da asa
Aumento 200x

FIGURA 15 – Corte transversal de embrião da raça Leghorn injetado no estágio 20 e fixado no estágio 28.

Notar: Ausência de células marcadas em regiões ventrais

TN- Tubo neural, **RV-** Regiões ventrais, **AD-** Aorta dorsal
Aumento 200x

*Notar nas duas figuras o padrão diferente de registro fotográfico de fluorescência (em amarelo) devido ao uso do filme de sensibilidade diferente(800 ASA)

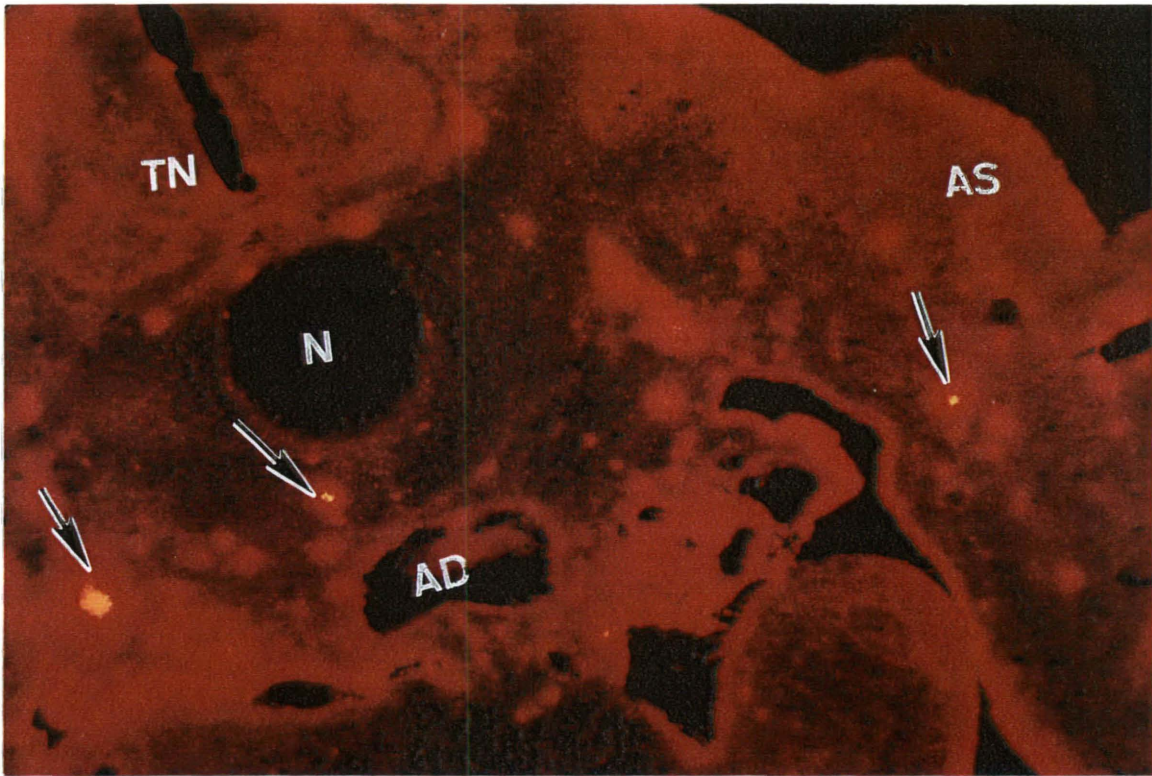


FIGURA 14

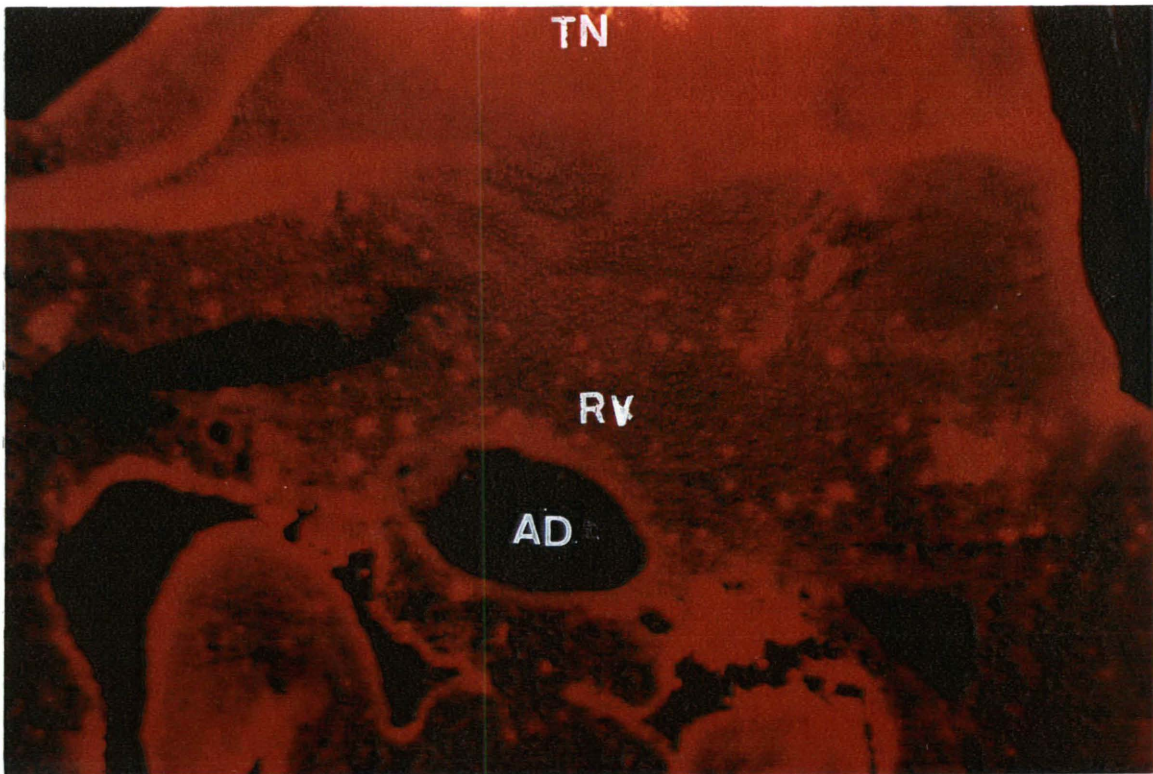


FIGURA 15

5 – DISCUSSÃO

O corante DiI já utilizado por Serbedzija e colaboradores em 1989 para determinar as vias migratórias tomadas pelas células de crista neural em aves, mostrou-se um bom marcador celular por incorporar-se de forma estável nas membranas celulares e não extravazar, permitindo o acompanhamento do destino da célula individualmente. Porém este é um marcador não específico que incorpora-se a qualquer célula do tubo neural que com ele entre em contato. Então, como podemos garantir que as células marcadas com este corante pertencem à linhagem de interesse neste estudo, a melanocítica? De acordo com a bibliografia :1) As células de crista neural de linhagem melanocítica migram por volta do estágio 19 do desenvolvimento embrionário no tronco de aves, quando já cessou a migração ventral (Erickson,1993); 2) Os melanócitos migram pela periferia do embrião e posteriormente entram na ectoderme (Erickson,1993); 3)Os melanoblastos são as únicas células capazes de migrar pela via dorsolateral ao nível do tronco de embriões de aves (Reedy et al, 1998 a); 4)As células que tomam a via dorsolateral ao nível do tronco por volta do estágio 19, já estão comprometidas com a linhagem melanocítica (Erickson e Goins,1995) e 5) As células de crista neural de linhagem melanocítica iniciam suas atividades migratórias pela via dorsolateral em estágios mais tardios quando a migração ventral já cessou (Serbedzija et al, 1989). Os estágios utilizados para nosso experimento foram próximos àquele em que se relata o início da migração pela via dorsolateral que compreende a população de melanócitos. Analisando nossos resultados, podemos sugerir que as células marcadas que se destacaram do tubo neural, migraram pela via dorsolateral e posicionaram-se próximas à ectoderme, na região do tronco de embriões das raças Sedosa japonesa e Leghorn (Estágios 18-28), são melanoblastos. Em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário da ave, os melanoblastos cessam sua saída do tubo neural (Serbedzija et al, 1989), por isso poucas células marcadas foram vistas próximas à região mais dorsal do tubo neural ou migrando pela via dorsolateral, em cortes de embriões injetados nos estágios 21-22 e fixados nos estágios 26-28. Então os estágios

pouco anteriores a estes (18-20), são ideais para o estudo da migração de melanoblastos em embriões de aves (ao nível do tronco). As aves Sedosa japonesa possuem um intensa pigmentação nas membranas viscerais, já evidente em embriões de 18 dias (Fig.3) (Vaz,1999) e por isso foram utilizadas neste trabalho para comparação com outra raça de pigmentação normal, no caso Leghorn, procurando verificar se existem ou não diferenças no padrão migratório dos melanoblastos. De acordo com nossos resultados , verificou-se migração ventral de células marcadas em Sedosa japonesa, como sugerido anteriormente por Reedy et al, 1998b, para explicar tal fenótipo. Esta migração ventral pode ser a causa da hiperpigmentação nas membranas viscerais de Sedosa japonesa, tendo em vista que além desta migração ventral , também verificou-se células marcadas que migraram pela via dorsolateral e desviaram-se para ocupar regiões ventrais aumentando a população de células marcadas nestas regiões. A entrada e migração de melanoblastos pela via ventral em Sedosa japonesa pode ser devida a fatores ambientais existentes em Sedosa que permitam a sobrevivência destas células e ocupação destas regiões por elas (Reedy et al,1998b). Ou por outro lado , a ausência de fatores inibitórios nas regiões ventrais de Sedosa que em outras aves impedem a migração de melanoblastos para estas áreas, podem explicar a diferença observada no padrão migratório desta raça se comparado com outras já descritas (Oakley et al,1994). Em embriões da raça Leghorn injetados nos estágios 18-20 e fixados nos estágios 24-28, não observou-se células marcadas migrando por vias ventrais ou ocupando regiões ventrais. Isto pode ocorrer devido a fatores ambientais inibitórios nas regiões ventrais como hialuronatos, proteoglicanas sulfatadas, moléculas reconhecidas por lectinas (como aglutinina de amendoim), que inibam a entrada e migração pela via ventral e povoação e sobrevivência de melanoblastos em regiões ventrais como sugerido por Oakley et al,1994), impedindo desta forma que existam células pigmentares em regiões ventrais desta ave. A hiperpigmentação de Sedosa japonesa pode ser devida à migração ventral de melanoblastos e também com sugerido em estudos mais recentes pela intensa

multiplicação destas células (Pástor,1999) , após seu estabelecimento em regiões ventrais dos embriões de Sedosa.

6 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos com este trabalho podemos concluir que:

- O destacamento de células de crista neural da região do tronco cessa após o estágio 20 em ambas as raças de galinhas: Leghorn e Sedosa japonesa.
- Em aves Leghorn (branca e perdiz) as células de crista neural de linhagem melanocítica , migram apenas pela via dorsolateral e posicionam-se próximas à ectoderme.
- Em aves Sedosa japonesa (branca e perdiz) as células de linhagem melanocítica migram por duas vias : pela via dorsolateral e também pela via ventral. As células que migram pela via dorsolateral posicionam-se na sua maioria próximas à ectoderme e algumas continuam migrando para alcançarem regiões mais ventrais; as células que migram pela via ventral posicionam-se em regiões mais ventrais do embrião.
- A migração ventral das células de crista neural pode ser a causa da hiperpigmentação visceral em galinhas da raça Sedosa japonesa.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUBAND, J.L.; MONIER, F.; DELANNET, M.; NEWGRENN, D. Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. **Acta. Anat.**, Basel, v.154, p.63-78, 1995.

ERICKSON, Carol A. Morphogenesis of the avian trunk neural crest: use of morphological techniques in elucidating process. **Micr.Res.Tech.**, Davis, v 26, p.329-351, 1993.

ERICKSON, C.A.; GOINS, T.L. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development**, Davis v.121, p.915-924, 1995.

ERICKSON, C.A.; GOINS, T.L. Sacral neural crest cell migration to the gut is dependent upon the migratory environment and not cell-autonomous migratory properties. **Dev.Biol.**, Davis, v.219, p.79-97, 2000.

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.

KITAMURA, K.; TAKIGUCHI, HAYASHI, K.; SEZAKI, M.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, T. Avian neural crest cells express a melanogenic trait during early migration from the neural tube: Observations with the new monoclonal antibody, "MEBL-1". **Development, (Camb.)** v.114, p.367-378, 1992.

LE DOUARIN, N.M.; TEILLET, M.M. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. **Dev.Biol**, Cambridge, v.41, p.162-184, 1974.

LE DOUARIN, N. **The neural crest**, Cambridge: Cambridge Univ.Press, 1982, p.259pp.

LE DOUARIN, N.M.; ZILLER, C. Plasticity in neural crest cell differentiation. **Curr Opin.Cell Biol.**, Cambridge, v.5, p.1036-1043, 1993.

OAKLEY, R.A.; LASKY, C.J.; ERICKSON, C.A.; TOSNEY, W. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. **Development, (Camb.)**, v.120, p.103-114, 1994.

PÁRTOR,M.V.D., **Análise de proliferação celular em embriões de aves com diferentes padrões de pigmentação.** Curitiba,1999. 17f. Dissertação (mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REEDY,M.V. ;FARACO,C.D. ; ERICKSON,C.A . The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. **Dev.Biol**, Orlando, v.200, p.234-246,1998a.

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.

SERBEDZIJA,G.N.; BRONNER-FRASER,M; FRASER, S.E. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. **Development., (Camb.)**, v.106,p.809-816,1989.

VAZ, S. A. S. **Análise da distribuição de células de linhagem melanocítica de aves com padrões distintos de pigmentação em diferentes estágios de desenvolvimento.** Curitiba, 1999. 61 f. Dissertação (mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

WEHRLE-HALLER,B.; WESTON,J.A. Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway, **Development, (Camb.)**,v.121,p.731-742,1995.