PATRÍCIA FRANCHI DE FREITAS

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR LIGANTES À LECTINA DE *Arachis hypogaea* (PNA) NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES DE AVES (*Gallus gallus*).

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Cloris Ditzel Faraco

CURITIBA

2002

PATRÍCIA FRANCHI DE FREITAS

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR LIGANTES À LECTINA DE *Arachis hypogaea* (PNA) NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES DE AVES (*Gallus gallus*).

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Cloris Ditzel Faraco

CURITIBA

2002

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR LIGANTES A PNA NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES DE AVES *(GALLUS gallus)*** ", de autoria da pós-graduanda **Patrica Franchi de Freitas**, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dra. Cloris Ditzel Faraco (Orientadora e Presidente do Departamento de Biologia Celular da UFPR), Dra. Andréa Novais Moreno (PUC-PAR) e Dr. Silvio Sanches Veiga (Departamento de Biologia Celular – UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Cloris Ditzel Faraco, nota: 10,0 (dez); Dra. Andréa Novais Moreno, nota: 10,0 (dez) e Dr. Silvio Sanches Veiga, nota: 10,0 (DEZ). De acordo com as exigências do Regulamento do Program de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: APROVADA com a nota: 10,0 (DEZ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 22 de Agosto de 2002.

Cloris D. Faraco
Dra. Cloriz Ditzel Faraco

Andréa Novais Moreno
Dra. Andréa Novais Moreno

Silvio S. Veiga
Dr. Silvio Sanches Veiga

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Jair e Leonina, por toda dedicação, além da eterna compreensão e carinho dispensados durante a realização deste objetivo.

Ao meu amor Samuel, pelo carinho, compreensão e incentivo constantes, principalmente nas horas de angústia e cansaço.

À Profª. Cloris, pela orientação, incentivo e amizade com que me acolheu e encaminhou, o meu mais profundo respeito e carinho. E também por estar sempre presente em todos os momentos e por ser exemplo de profissional competente, por quem tenho especial admiração.

AGRADECIMENTOS

- Aos amigos do Laboratório, em especial à Carol, Marisinha, Renata, Fabiana e Simone, pela paciência, incentivo e amizade em todos os momentos. E à Carol e Marisinha pela divisão de material e pelo alto astral sempre.

- À amiga Cristina pelo apoio e pelo esforço em levar as pranchas até Ponta Grossa para a confecção das cópias coloridas.

- Às minhas irmãs, Priscila e Poliana, por compartilharem comigo este momento especial.

- À Ana Cristina e seu esposo Cláudio pelo apoio, incentivo e amizade sempre.

- Ao Roberto, Mara e Rafaella, pelo incentivo e carinho.

- À amiga Mariana por toda compreensão, carinho e amizade tão importantes em todos os momentos.

- À Profª. Cecília, do Departamento de Biologia Celular, pela doação de ovos das galinhas da raça Sedosa.

- À Marlene e Gerisalda, Secretárias do Programa de Pós-Graduação e Departamento de Biologia Celular, pela disposição com a qual sempre me receberam.

- Aos Professores do Departamento de Biologia Celular, em especial Prof. Luís Fernando Fávaro, e colegas do curso de Pós-Graduação pelo convívio amigo.

- À Dra. Carol A. Erickson pela cessão de alguns materiais indispensáveis à realização deste trabalho.

- Ao Prof. Edson Gonçalves de Oliveira, do Departamento de Zootecnia, pela ajuda na manutenção do aviário.

- À Profª. Ruth, do Departamento de Biologia Celular, pela doação de galactose.

- Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, que de alguma forma contribuíram na realização deste tabalho.

- Aos funcionários do aviário da Fazenda Experimental da UFPR, Ademildo Batista Franco e Ivo Gonçalves, pela colaboração fundamental na execução deste trabalho.

- À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela bolsa concedida.

- À todos aqueles que de qualquer forma contribuíram para a realização deste trabalho.

- E a Deus, por ter colocado todas essas pessoas em meu caminho: Muito obrigada!

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades,

porque as grandes proezas da vida foram

conquistas do que parecia impossível."

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS viii

LISTA DE ABREVIATURAS x

RESUMO xii

ABSTRACT xiii

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 01

2- OBJETIVOS 23

3- MATERIAL E MÉTODOS 25

4- RESULTADOS 29

5- FIGURAS 38

6- DISCUSSÃO 63

7- CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Corte transversal de região vagal de embriões no estágio 11 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (400X) e **(b)** embrião de Sb (400X) 39

Figura 2- Corte transversal de região vagal de embriões no estágio 16/17 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (100X) e **(b)** embrião de Sb (100X) 40

Figura 3- Corte transversal de região do tronco (somitos 18 a 23) de embrião de Sb no estágio 16/17 (HH). **(a)** com marcação pela PNA (400X) e **(b)** com imunomarcação pelo HNK-1 (400X) 41

Figura 4- Corte transversal de região do tronco (somitos 18 a 23) de embrião de Lb no estágio 18/19 (HH). **(a)** com marcação pela PNA (200) e **(b)** com imunomarcação pelo HNK-1 (200X) 43

Figura 5- Corte transversal de região sacral de embriões no estágio 18/19 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X), **(b)** embrião de Sb com marcação pela PNA (400X) e **(c)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X) 44

Figura 6- Corte transversal de região sacral de embriões no estágio 20/21 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (200X), **(b)** embrião de Sb com marcação pela PNA (200X) e **(c)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (200X) 47

Figura 7- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embrião de Sb no estágio 18 (HH) com marcação pela PNA (200X) 50

Figura 8- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embriões no estágio 20 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (200X) e **(b)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X) 51

Figura 9- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embriões no estágio 22 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X), **(b)** embrião de Sb com marcação pela PNA (100X), **(c)** embrião de Lb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X) e **(d)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X) 53

Figura 10- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embriões no estágio 24 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (100X) e **(b)** embrião de Sb (100X) 55

Figura 11- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embriões no estágio 26 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X), **(b)** embrião de Sb com maração pela PNA (100X) e **(c)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X) 57

Figura 12- Corte transversal de região do tronco (somitos 10 a 17) de embriões no estágio 28 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA(100X), **(b)** embrião de Sb com marcação pela PNA (100X), **(c)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (200X) e **(d)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X) 60

LISTA DE ABREVIATURAS

ad	- aorta dorsal
ANNA-1	- anticorpo que reconhece neurônios humanos
BMP	- proteína morfogenética de osso
BSA	- soro albumina bovina
CN	- crista neural
CSAT	- anticorpo que reconhece a subunidade β1 de integrinas de galinha
dl	- via dorsolateral
e	- endoderme
E/C8	- anticorpo monoclonal que reconhece uma população de células da crista neural no momento em que elas migram do nível vagal para os arcos branquiais
et al.	- *et alli*
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
GFAP	- anticorpo que reconhece células gliais
grd	- gânglio de raiz dorsal
HH	- Hamburger & Hamilton
HNK-1	- anticorpo monoclonal que reconhece um oligossacarídeo (sulfato-3 GlcA β (1→3) Gal β (1→4) GlcNAc β (1→3) Gal β (1→4) Glc β (1→1)-ceramida) de superfície celular de células da crista neural
IgM	- imunoglobulina M
Lb	- Leghorn branca
M	- molar
md	- mesentério dorsal

MEC	- matriz extracelular
mM	- milimolar
MSA	- "migration staging area" - uma região entre o tubo neural e a porção mais dorsal do somito
n	- notocorda
NC-1	- anticorpo monoclonal que reconhece células de crista neural
np	- nervo periférico
PBS	- solução salina tamponada com fosfato
PNA	- lectina de *Arachis hypogaea*
QCPN	- anticorpo que reconhece células da crista neural de codorna
s	- somito
Sb	- Sedosa branca
SMP	- proteína mielina de célula de Schwann
SNP	- sistema nervoso periférico
TD ou td	- tubo digestivo
TGF	- fator de crescimento transformante
tn	- tubo neural
v	- via ventral
Wnt	- molécula sinalizadora da família de proteínas de secreção parácrina altamente conservadas que regulam interações célula-célula
μm	- micrômetro

RESUMO

A crista neural (CN) dá origem a vários derivados, entre eles os neurônios e células gliais do SNP, cujos precursores migram ventralmente entre o tubo neural e o somito, e os melanócitos, cujos precursores (melanoblastos) migram dorsolateralmente entre o somito e a ectoderme. Aves que apresentam padrões normais de pigmentação, restringem o destino de melanócitos unicamente ao nível da pele, e aves como a mutante hiperpigmentada Sedosa japonesa, que apresentam um padrão alterado de pigmentação mostram um acúmulo destas células distribuindo-se em órgãos internos, além da pele. O presente trabalho teve como objetivo analisar a participação de moléculas da MEC (glicoconjugados) ligantes a PNA (lectina do amendoim), citadas como inibidoras da migração das células da CN, no trajeto ventral das células da CN nos três níveis axiais (vagal, tronco e sacral), e no trajeto dorsolateral ao nível do tronco nas diferentes fases desta migração em ambas as linhagens de aves. As células que migram ventralmente (linhagem neuronal) alcançam o tubo digestivo (TD) somente aos níveis vagal e sacral. Os resultados mostraram que o caminho ventral apresenta um gradiente de distribuição de glicoconjugados PNA-positivos, com o espaço perinotocordal fortemente marcado enquanto que próximo ao dermomiótomo a marcação é fraca. Células da CN (reconhecidas pelo anticorpo HNK-1) foram observadas neste caminho em regiões fracamente marcadas em embriões de ambas as raças de galinhas, sugerindo que células da CN da linhagem neuronal são capazes de migrar por caminhos com certa quantidade de glicoconjugados PNA-positivos. Observamos também que ao nível do tronco, os glicoconjugados PNA-positivos estão ausentes do mesentério dorsal (o qual é o portal de entrada para o TD) em momentos anteriores à chegada das células da CN nesta região. Quando estas células poderíam antinjí-lo, uma barreira destes glicoconjugados se estabelece numa concentração muito grande, podendo ser este um dos motivos pelos quais as células da CN não alcançam o TD ao nível torácico, já que aos níveis vagal e sacral não se observa esta marcação. Durante a migração dorsolateral, glicoconjugados PNA-positivos anteriormente localizadas no caminho dorsolateral se reduzem enquanto a migração avança por essa via. Observamos que em embriões de Lb nos estágios 26 e 28 (HH) existe uma faixa de moléculas PNA+ preenchendo todo o trajeto ventral, o espaço perinotocordal e a região da extremidade ventral do somito, formando uma barreira molecular para as células da CN que nesse momento migram dorsolateralmente. Em embriões de Sb a marcação é fraca e ainda mostra falhas, o que pode permitir que as células da CN que migram dorsolateralmente (melanoblastos) invadam toda a região ventral do embrião, seja pelo caminho ventral ou desviando-se do caminho dorsolateral e entrando através da extremidade mais ventral do somito, para povoar a região ao redor da aorta dorsal e mesentério dorsal.

ABSTRACT

The neural crest gives rise to many derivatives, as neurons and glial cells, whose precursors migrate ventrally, between the neural tube and the somite, and the melanocytes, derived from precursors that follow the dorsolateral pathway, between the somite and ectoderm. In chickens with normal pigmentation pattern, melanocytes are restricted to the skin, while in the mutant japanese Silky chicken, they accumulate in many internal organs and in the skin. This work aimed to analyse the role of potencially inhibitory extracellular matrix molecules, PNA(peanut agglutinin)-binding glycoconjugates, in the ventral migration of neural crest cells at three axial levels (vagal, trunk and sacral) and in the dorsolateral pathway at trunk level at different times of migration in White Leghorn (WL) and japanese Silky chicken (SK) embryos. Neural crest cells migrating ventrally (neuronal lineage) reach the gut only at vagal and sacral levels. Our results showed a gradient of distribution of PNA-positive glycoconjugates in the ventral pathway, with strong labeling in the perinotochordal region and weak labeling near the dermomyotome. Neural crest cells (labeled with HNK-1 antibody) were observed in regions weakly labeled by PNA in embryos of both strains analysed, suggesting that neural crest cells of neuronal lineage are able to follow pathways with a certain amount of PNA-positive glycoconjugates. At trunk level, PNA-positive glycoconjugates weren't detected in the dorsal mesentery, the region of acess to the gut, prior to the time of arrival of neural crest cells. At stages when the cells were reaching the dorsal mesentery, a strong labeling was observed, and this might constitute a barrier to the entrance of the cells at this axial level, while at vagal and sacral levels no labeling was present. During the dorsolateral migration, PNA-positive glycoconjugates disappeared from the pathway while migration proceeds. In stages 26 and 28 (HH) WL embryos a strong band of PNA-positive glycoconjugates was present, blocking the entire ventral pathway, the perinotochordal region and the ventral tip of the somite, probably forming a molecular barrier for the neural crest cells which migrate exclusively through the dorsolateral pathway. In SK embryos at the same stages, there was only a weak labeling, with gaps clear of PNA-positive glycoconjugates, that might constitute narrow paths through which neural crest cells of melanocytic lineage can invade ventral regions of the embryo, coming by the ventral pathway or exiting the dorsolateral pathway, turning around the ventral end of the somite and populating the region around the dorsal aorta and dorsal mesentery.

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A crista neural se forma durante a neurulação, quando ocorre o espessamento da placa neural, que se invagina até fundir as duas extremidades (pregas neurais), fechando o tubo neural. Assim que o tubo neural se fecha, as células da crista neural iniciam a migração que se dá numa orientação ântero-posterior (BRONNER-FRASER, 1994).

ERICKSON (1993) relacionou hipóteses propostas na tentativa de explicar como as células da crista neural se destacam do tubo neural e iniciam sua migração. A primeira é com relação à lâmina basal que recobre a região mais dorsal do tubo neural (onde as células da crista neural se desligam do tubo neural), propondo que esta lâmina basal deve estar incompleta no momento do desligamento, por alterações causadas pelas próprias células da crista neural (por proteases), ou por ausência ou pequena produção de moléculas da matriz extracelular, formando uma lâmina basal incompleta. A segunda proposta seria quanto ao estabelecimento de um substrato apropriado à migração das células da crista neural na região acima do tubo neural, combinada com a expressão de receptores celulares que possam interagir e aderir a esse substrato. ERICKSON & PERRIS (1993) já relataram que fibronectina, laminina, colágenos I, IV e VI, e proteoglicanos heparan sulfatados estão localizadas na matriz extracelular que cobre a superfície dorsal do tubo neural antes da emigração das células da crista neural. A terceira proposta de ERICKSON (1993) trata da geração de motilidade pelas células da crista neural. Em muitas ocasiões durante o desenvolvimento, células são imóveis até um momento apropriado, quando então elas repentinamente iniciam a migração. Os fatores que ativam a motilidade celular nos sistemas de desenvolvimento ainda são desconhecidos, mas uma classe de moléculas, conhecidas como fatores estimulantes da motilidade, podem desempenhar um importante papel na coordenação e regulação dos movimentos morfogenéticos. A quarta proposta diz respeito a mudanças na adesividade entre as células da crista

neural e as células do epitélio neural, que parecem preceder e conseqüentemente favorecer a emigração. Moléculas de adesão como a A-CAM (N-caderina) e N-CAM parecem estar reduzidas em células pré-migratórias, podendo desencadear a migração. ERICKSON (1993) propõe também alguns mecanismos que poderiam levar a essa diminuição nas moléculas de adesão: a) regulação negativa das moléculas de adesão; b) degradação das moléculas de adesão por proteases; c) modificações bioquímicas nos ligantes de adesão que poderiam mudar a afinidade (ex.: fosforilação). A quinta hipótese de ERICKSON (1993) é a geração de uma força tracional suficiente para puxar as células da crista neural para fora do complexo juncional (não há evidências diretas que comprovem esta hipótese). E a sexta e última hipótese é que o plano de clivagem durante a citocinese poderia separar as células-filhas das junções apicais. Se o fuso mitótico for orientado perpendicular à superfície do epitélio, o plano de clivagem seria tal que uma das células-filhas estaria presa às vizinhas no lado voltado para a luz do tubo neural via junções aderentes, enquanto que a outra célula-filha estaria livre para migrar. Após as células da crista neural terem se destacado do epitélio neural, elas iniciam sua migração através do embrião. Através de cultura de tecidos, ERICKSON (1988) pôde demonstrar que o direcionamento da migração das células da crista neural é provavelmente devido a inibição por contato. Através de experimentos com enxertos, essa autora sugere que quimiotaxia e haptotaxia não desempenham um papel no controle do desligamento das células da crista neural do tubo neural. A extraordinária habilidade das células da crista neural na dispersão dentro do embrião tem sido documentada, quando realizam-se enxertos de células de crista neural de um local para outro onde normalmente elas não migram, há evidência de que a produção celular de ativador de plasminogênio, uma enzima proteolítica, e também a força tracional mínima que as células da crista neural exercem sobre o substrato no qual elas migram, contribuem para esta habilidade migratória (ERICKSON, 1988).

ERICKSON e colaboradores (1980) verificaram que células da crista neural e seus derivados são altamente invasivos em seu caminho migratório normal, bem como em ambientes não familiares, sugerindo que as células da crista neural por si só apresentam habilidades migratórias especiais em tecidos embrionários. Além

disso, BEUVAIS e colaboradores (1995) observaram que células do sarcoma 180 são capazes de seguir a mesma rota das células da crista neural. Então além de habilidades migratórias especiais das células da crista neural, ainda o ambiente embrionário é permissível à migração não só de células da crista neural como também de células transformadas que também apresentam alta motilidade e invasividade.

Estudos anteriores sugerem que receptores de adesão celular estão envolvidos no controle da migração da crista neural, os quais incluem integrina, N-CAM e caderina (revisado por ERICKSON & PERRIS, 1993). As células da crista neural expressam integrinas e usam-nas para aderir à matriz extracelular (BRONNER-FRASER, 1985; DUBAND *et al.*,1991; LALLIER & BRONNER-FRASER, 1993).

NAKAGAWA & TAKEICHI (1995) identificaram duas caderinas, c-cad6B e c-cad7, expressadas por células da crista neural em seus estágios pré-migratório e migratório, respectivamente, em embriões de ave. Experimentos de transfecção de cDNA mostraram que ambas são moléculas de adesão homofílica (entre células de mesma linhagem), prendendo células com adesividade específica. Estes autores constataram que durante o desenvolvimento, c-cad6B apareceu nas células das pregas neurais, estando localizada na área da futura crista neural. Esta expressão foi mantida durante o fechamento do tubo neural, mas desapareceu após as células da crista neural terem partido do tubo neural, sugerindo seu papel na fusão das pregas neurais e/ou na formação e manutenção do futuro domínio da crista neural na placa/tubo neural. As células de crista neural que partem do tubo neural param de expressar c-cad6B, e uma subpopulação delas começa a expressar c-cad7, expressão que continua durante sua migração. Estas células expressando c-cad7 migram agrupadas e vão povoar os gânglios da raiz ventral e dorsal. Com estes resultados, os autores sugerem que as células migrantes são agrupadas dentro de subpopulações expressando diferentes caderinas.

A crista neural dá origem a um grande número de derivados celulares que vão colonizar diferentes regiões no embrião, entre eles melanócitos, neurônios, células de Schwann, células endócrinas e paraendócrinas, componentes

conjuntivos e esqueléticos do crânio (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Portanto, a crista neural é um ótimo modelo para o estudo de migração e diferenciação celular, já que apresenta diferentes vias de migração e é capaz de originar muitos fenótipos diferentes.

DULAC & LE DOUARIN (1991) produziram um anticorpo monoclonal contra a proteína mielina de célula de Schwann (SMP), uma glicoproteína expressa por células de Schwann mas não por células satélite de gânglio ou células entéricas e estudaram se a expressão de SMP é regulada pelo ambiente nos diferentes compartimentos do Sistema Nervoso Periférico. Associaram heterocronicamente células da crista neural de codorna dos níveis mesencefálico e metaencefálico, vagal ou tronco com parede de tubo digestivo, pele ou tecido muscular de embriões de galinha, e observaram, em coculturas destes órgãos quiméricos, que como no desenvolvimento normal, as células gliais, caracterizadas pelo anticorpo HNK-1 (que reconhece célula de crista neural) e o marcador nuclear de codorna, expressaram o fenótipo SMP exclusivamente na pele e músculo, falhando a expressão no tubo digestivo. No entanto, quando células de Schwann SMP-positivas de nervo ciático de codorna foram cocultivadas com tubo digestivo de galinha, rapidamente perderam sua imunorreatividade SMP inicial, enquanto que, quando associadas com músculo e pele, as células de Schwann permaneceram SMP-positivas, na completa ausência de células neuronais. Além disso, esses autores também observaram que plexos entéricos de tubo digestivo de codornas expressam SMP e laminina quando retirados do ambiente mesênquima-intestinal, mostrando que SMP pode ser expressa por células gliais entéricas e que as células de Schwann com fenótipo SMP são fortemente inibidas pelo ambiente da parede do tubo digestivo, resultados que sugerem que estes dois tipos de células gliais partem da mesma linhagem e que seu fenótipo final é modulado através de interações célula-célula. POMERANZ e colaboradores (1993) usaram o anticorpo primário NC-1 (que também reconhece células de crista neural) em galinha, codorna e rato, e anticorpo que reconhece uma proteína ligante a laminina de 110 kDa (α-110) em camundongo, reconhecidas por anticorpo secundário acoplado a esferas magnéticas para realizar uma imunoseleção de células de crista neural precursoras em tubo digestivo em desenvolvimento. Estas células foram cultivadas e, através de

imunocitoquímica, verificaram que as células NC-1-positivas desenvolveram neurônios e células gliais, e que alguns fenótipos expressados por neurônios *in vitro* foram apropriados para o tubo digestivo (imunorreatividade para serotonina e para peptídeo intestinal vasoativo). No entanto, neurônios catecolaminérgicos, os quais não estão presentes no sistema nervoso entérico, também se diferenciaram em cultura. Além desses resultados, também observaram que o desenvolvimento neuronal, bem como o crescimento de neurito, foram promovidos pela laminina, e que as células selecionadas com α-110 de intestino fetal de camundongo preferencialmente originaram neurônios e glia *in vitro*. Com estes resultados, puderam sugerir que a população de células derivadas da crista neural que colonizam o tubo digestivo são multipotentes, que o desenvolvimento de neurônios catecolaminérgicos *in situ* é evitado pelo microambiente entérico intacto, que a laminina é importante na formação do gânglio entérico, e que a proteína ligante a laminina de 110 kDa é expressa na superfície de precursores imediatos de neurônios e glia entéricos.

A migração ocorre de diferentes formas dependendo do nível axial analisado. Ao nível do tronco, as células da crista neural seguem dois caminhos migratórios. A primeira via de migração, assim que o tubo neural se fecha, é ventral, entre o tubo neural e o somito e mais tarde através do esclerótomo, e estas células que migram ventralmente vão originar neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico e células adrenomedulares (BRONNER-FRASER, 1986; SERBEDZIJA et al., 1989). A segunda onda de migração, 24 horas após a primeira, é dorsolateral, entre o somito e a ectoderme, e estas células originarão as células pigmentares, os melanócitos (HULLEY et al., 1991). Na região vagal, ocorrem três ondas migratórias diferentes. Uma primeira onda dorsolateral, uma onda intermediária ventral e uma última onda também dorsolateral. As células da primeira onda dorsolateral invadem os arcos branquiais e não se diferenciam como melanócitos *in vitro*, tendo-se sugerido que o ambiente dos arcos branquiais não permite a sobrevivência ou diferenciação de células da crista neural melanogênicas (CIMENT & WESTON, 1985). Na última onda migratória, também dorsolateral, as células não invadem os arcos branquiais e são especificadas como melanoblastos (REEDY et al., 1998b). A onda migratória ventral povoa o intestino e origina os gânglios entéricos (LE DOUARIN & TEILLET,

1973). Na região sacral, as células da crista neural migram através dos caminhos dorsolateral e ventral, e originam os melanócitos e os gânglios entéricos da porção pós-umbilical do tubo digestivo (LE DOUARIN & TEILLET, 1974).

Os melanoblastos (precursores de melanócitos) migram somente pelo caminho dorsolateral (ERICKSON & GOINS, 1995; REEDY et al., 1998b), por isso, na maioria das aves, são quase que exclusivamente encontrados em tecidos periféricos como derme e ectoderme (HULLEY et al., 1991). Segundo ERICKSON & GOINS (1995) os precursores de melanócitos precisam ser especificados para seguir a migração dorsolateral, e o direcionamento da migração para o caminho dorsolateral pode ser dependente de mudanças no ambiente da matriz extracelular, através do qual os melanoblastos vão se locomover, além de propriedades migratórias próprias dessas células. Em galinhas mutantes, Sedosas japonesas hiperpigmentadas, foi observado acúmulo de células pigmentares que conferem uma coloração negra a determinados órgãos como pele, músculo, costelas, vasos cardíacos, pericárdio, língua, traquéia e adrenal; e completa ausência de pigmentação no coração e fígado (FARACO et al., 2001). Esse acúmulo de células pigmentares é progressivo conforme o estágio de desenvolvimento, estando drasticamente aumentado na fase adulta. REEDY e colaboradores (1998b) observaram que os melanoblastos de galinhas Sedosa migram tanto pelo caminho dorsolateral como pelo caminho ventral, sendo encontrados em regiões médio-ventrais em embriões de galinhas Sedosa enquanto que em embriões de galinhas Leghorn ou de codornas povoam somente áreas periféricas. Estes autores sugerem duas possibilidades para esse padrão de pigmentação diferenciado em galinhas Sedosa, a primeira é que o ambiente promove uma maior mobilidade dos melanoblastos, como sugerido pela forte dispersão dorsolateral inicial de melanoblastos observada nesta galinha. A segunda é que o ambiente nas galinhas Sedosa estimula uma grande proliferação dos melanoblastos.

Diferentes moléculas de superfície celular e da matriz extracelular estão distribuídas ao longo dos caminhos migratórios das células da crista neural, formando um substrato que pode permitir a migração da crista neural ou desempenhar um papel inibitório, impedindo que células da crista neural entrem em determinadas áreas do embrião. Moléculas como colágeno, fibronectina e

glicosaminoglicanas sulfatadas podem atuar como substrato que promove motilidade da crista neural *in vitro*, na ausência de soro (ERICKSON & TURLEY, 1983). Estes autores observaram que se adicionar condroitin sulfato ao meio de cultura (seja com fibronectina, com colágeno ou com fibronectina + colágeno) as células da crista neural se tornam arredondadas, sugerindo um decréscimo na adesão célula-substrato. Entretanto este polímero não reduz significativamente nem estimula a velocidade dos movimentos das células da crista neural em cultivo. Já hialuronato apresentou pequeno efeito sobre a morfologia das células quando adicionado para adsorver com fibronectina ou fibronectina + colágeno, mas causou uma redução marcante na velocidade de movimentos, podendo indicar redução na adesão celular. É possível que hialuronato reduza a velocidade de movimentos devido a efeitos na viscosidade do meio. Estes autores ainda observaram que a atração das células da crista neural ao condroitin sulfato é mediada em parte pelo hialuronato sobre a superfície da célula da crista. Evidência para isto vem de experimentos nos quais hialuronidase de *Streptomyces* reduziu a atração das células da crista ao condroitin sulfato mas aumentou a atração à fibronectina, sugerindo que hialuronato da superfície celular pode ligar a condroitin sulfato mas cobrir moléculas ligantes a fibronectina na superfície celular. Baseados nesses resultados, é razoável especular que fibronectina é a molécula primária para a qual células da crista neural são atraídas e se movem *in vivo*, e que a alta concentração desta molécula ao longo do caminho migratório é crucial na determinação do caminho que as células da crista neural vão seguir. PERISSINOTTO e colaboradores (2000) por imunocitoquímica e hibridização *in situ*, examinaram a distribuição e o provável papel de dois principais proteoglicanos ligados a hialuronana, PG-M/versicans e agrecan, durante o desenvolvimento da crista neural de ave, e com os dados observados sugerem que PG-M/versicans e agrecan notocordais exercem funções de direcionamento divergentes durante a dispersão das células da crista neural, as quais são mediadas por suas proteínas centrais e suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos, e podem envolver fenômeno de motilidade semelhante a haptotactismo. Enquanto agrecan define áreas embrionárias estritamente impenetráveis, PG-M/versicans são componentes

centrais dos caminhos migratórios das células da crista neural favorecendo os movimentos direcionados das células.

Células embrionárias migrantes apresentam altos níveis de atividade galactosiltransferase (GalTase) na superfície celular, sendo assim proposto que GalTase participa na migração por reconhecer e ligar-se a resíduos terminais N-acetilglucosamina (GlcNac) sobre glicoconjugados dentro da matriz extracelular (SHUR, 1982). RUNYAN e colaboradores (1986) testaram esta atividade em cultivo de células da crista neural, usando a proteína GalTase modificada, α-lactalbumina (α-LA), para inibir GalTase de superfície de ligar aos resíduos terminais GlcNac em substratos delineados. Observaram que α-LA inibiu a migração de células da crista neural sobre matrizes semelhantes a lâmina basal de modo dose-dependente, enquanto que em condições idênticas, α-LA não apresentou efeito sobre a migração sobre fibronectina. E, usando proteínas controle, como uma lisozima (estruturalmente homóloga a α-LA) e BSA, verificaram que estas não afetaram a migração nestas mesmas matrizes. Estes autores observaram também que a adição de substrato catalítico de GalTase, UDP galactose, resultou num aumento dose-dependente no grau de velocidade da migração das células da crista neural, e que sob condições idênticas, o açúcar nucleotídeo inapropriado, UDP glucose, não teve efeito. Com estes resutados, RUNYAN e seus colaboradores (1986) conseguiram mostrar que GalTase de superfície celular participa na migração das células da crista neural por reconhecimento e ligação aos seus substratos apropriados (laminina) na matriz delineada e que estas células empregam pelo menos dois mecanismos distintos para interação com a matriz extracelular durante a migração, um que é dependente de fibronectina e outro que usa reconhecimento GalTase de glicoconjugados de lâmina basal. EPPERLEIN e colaboradores (1988), trabalhando com embriões de anfíbios, observaram, através de imunohistoquímica, que fibronectina e tenascina estão presentes na matriz extracelular que cobre os caminhos migratórios da crista neural no momento em que elas estão migrando ativamente. Verificaram que fibronectina está presente na matriz extracelular embrionária antes da migração das células da crista neural, enquanto que tenascina só aparece no momento do início da migração. Testando, *in vitro*, substratos de migração para células da crista neural de anfíbios, perceberam que estas células

usam fibronectina como substrato migratório e não tenascina, os autores então sugerem que, uma interação entre estes componentes da matriz extracelular é importante na regulação do subgrupo e caminhos migratórios das células da crista neural no embrião de anfíbio. Diferentemente dessa hipótese, MACKIE e colaboradores (1988), também trabalhando com a distribuição de fibronectina e tenascina, só que comparando-a entre embriões de *Xenopus laevis*, codorna e rato, observaram que em todas as espécies estudadas, a distribuição de tenscina esteve mais estreitamente correlacionada com os caminhos migratórios das células da crista neural que a distribuição de fibronectina, a qual é conhecida por ser importante para a migração da crista neural. Também observaram *in vitro* que quando células da crista neural são cultivadas sobre um substrato de tenascina, elas não se espalham e ficam arredondadas, propondo que tenascina desempenha um papel importante na determinação dos caminhos migratórios das células da crista neural, talvez por alterar as interações destas células com fibronectina, ou por gerar caminhos de menos resistência que em meio a matrizes de fibronectina.

LORING & ERICKSON (1987) sugerem que células da crista neural torácica podem usar a lâmina basal do dermomiótomo como substrato migratório, e corroborando essa idéia, observaram que o desenvolvimento da lâmina basal do dermomiótomo coincide em tempo e localização com o subgrupo de células da crista que migra através do somito. Consistente com essa hipótese, TOSNEY e colaboradores (1994) observaram que células da crista neural preferem migrar sobre a lâmina basal do miótomo em vez de seguirem através do esclerótomo. POMERANZ e colaboradores (1991b) observaram que células derivadas da crista neural que formam estruturas neurais fixas, como gânglio de Remak, gânglios e nervos da raiz cranial e espinhal, expressam proteína ligante a laminina, enquanto que células da crista neural ainda em migração nas vizinhaças das regiões vagal e sacral, ou se aproximando do intestino, não expressam essa proteína, sugerindo que a laminina desempenha algum papel na formação dos gânglios entéricos. LALLIER & BRONNER-FRASER (1991) observaram que o anticorpo CSAT, que reconhece a subunidade β1 de integrinas de galinha, inibe a adesão celular, sugerindo que β1- integrinas estão envolvidas em interações entre células da crista neural e laminina, e que a adesão em baixas concentrações de laminina ocorre na

ausência de cátions divalentes, enquanto que em altas concentrações de laminina, a adesão requer > 0,1 mM Ca^{2+} ou Mn^{2+}. O anticorpo HNK-1, que reconhece um carboidrato de superfície celular, também inibe adesão de células da crista neural a laminina quando esta se encontra em baixas concentrações, mas não quando em altas concentrações. Pouco depois, estes mesmos autores, LALLIER & BRONNER-FRASER (1992), identificaram funcional e bioquimicamente um heterodímero de integrina $\alpha 1\beta 1$, o qual carrega o epítopo HNK-1 em células da crista neural, e usando um ensaio quantitativo de adesão celular, verificaram que este heterodímero medeia adesão a substrato de laminina preparado na presença de Ca^{2+}, estando na presença ou ausência de outros cátions divalentes no meio de adesão celular. Já a adesão de células da crista neural a substrato de laminina preparado na presença de EDTA, heparina, Mg^{2+} ou Mn^{2+}, requer Ca^{2+}. Estes autores também perceberam que as interações com este substrato de laminina são mediadas por um heterodímero diferente, já que anticorpos contra integrina $\beta 1$ inibiram a adesão das células da crista neural, mas anticorpos contra integrina $\alpha 1$ não inibiram esta adesão, assim sendo, o tipo de substrato de laminina parece ditar a escolha do receptor de laminina usado pelas células da crista neural. Além disso, verificaram que a conformação da laminina é determinada pela proporção de laminina e Ca^{2+}, entretanto a incorporação de heparina durante a polimerização do substrato altera a conformação na presença de Ca^{2+}, após polimerização, o substrato parece estável, não sendo alterado pela embebição em EDTA ou cátions divalentes.

KROTOSKI e colaboradores (1986) também usando o anticorpo CSAT, observaram que existe uma codistribuição do antígeno CSAT e de fibronectina e laminina em embriões precoces de ave. Verificaram que este antígeno está presente em numerosos tecidos durante a gastrulação, a neurulação e a migração das células da crista neural. Além disso, verificaram que os caminhos seguidos pelas células da crista neural cranial estavam cobertos com fibronectina e laminina, e que na região do tronco, fibronectina e laminina foram observadas ao redor de uma subpopulação de células da crista neural, no entanto, nenhuma molécula exibiu o padrão de distribuição seletivo necessário para o papel de guiar a migração da crista neural no tronco, concluindo então que os níveis de CSAT, fibronectina e laminina são dinâmicos no embrião, talvez refletindo que o balanço de adesões

superfície-substrato contribui para iniciação, migração e localização de algumas populações de células da crista neural. No entanto, estes autores, sugerem que nem fibronectina e nem laminina apresentam a distribuição necessária para servir como as únicas moléculas guiantes para as células da crista neural do tronco.

DELANNET e colaboradores (1994) examinaram, através de imunoprecipitação e imunocitoquímica, o possível papel da vitronectina e seu receptor integrina correspondente na adesão e migração das células da crista neural. Observaram que as células da crista neural expressam primariamente as integrinas αVβ1, αVβ3 e αVβ5 como possíveis receptores de vitronectina, e com estes resultados, sugerem que as células da crista neural podem aderir a e migrar sobre vitronectina *in vivo* por um mecanismo RGD-dependente envolvendo ao menos as integrinas αVβ1, αVβ3 e αVβ5 e que estas integrinas podem desempenhar papéis específicos no controle da adesão e migração celular.

Células da crista neural migratórias aderem a fibronectina de modo integrina-dependente (KROTOSKI et al., 1986) enquanto mantém reduzidos os contatos intercelulares mediados por N-caderina (NAKAGAWA & TAKEICHI, 1995). MONIER-GAVELLE & DUBAND (1997) impediram a migração das células da crista neural usando peptídeos RGD ou anticorpos para fibronectina e para integrinas β1 e β3, o que causou rápido agrupamento celular mediado por N-caderina. Esse restabelecimento de contatos intercelulares estáveis resultou essencialmente do recrutamento de um "pool" intracelular de moléculas N-caderina que se acumularam em junções aderentes em firme associação com o citoesqueleto e não da redistribuição de um "pool" pré-existente de moléculas N-caderina de superfície. Além disso, a adição de agentes que causam aumento de Ca^{2+} intracelular, após cruzar a membrana plasmática, foram potentes inibidores da agregação celular e reduziram as junções mediadas por N-caderina nas células. Finalmente observaram que elevada fosforilação serina/treonina de cateninas associadas com N-caderina, acompanhou a restauração de contatos intercelulares. Com estes resultados, os autores sugerem que, em células da crista neural migratórias, integrinas β1 e β3 são a origem de uma cascata de eventos sinalizadores que envolve fluxo transmembrana de Ca^{2+}, seguido pela ativação de fosfatases e quinases, e que controla a distribuição superficial e atividade de N-caderina.

O proteoglicano condroitin sulfato e moléculas que se ligam a PNA (lectina: aglutinina do amendoim que apresenta afinidade de ligação a açúcares galactose-N-acetilgalactosamina, com especificidade para se ligar a resíduos de galactose em geral O-ligados) estão relacionadas com inibição da migração das células da crista neural. OAKLEY e colaboradores (1994) mostraram que há uma redução do proteoglicano condroitin sulfato e de moléculas ligantes a aglutinina de amendoim (PNA) no caminho dorsolateral a partir do estágio 19 do desenvolvimento. Além disso, se o dermomiótomo é removido antes da emigração de células do tubo neural, o proteoglicano condroitin sulfato e moléculas ligantes a PNA estão ausentes e a invasão do caminho pelas células da crista neural é acelerada (ERICKSON et al., 1992). NEWGREEN e colaboradores (1986) demostraram que notocordas em cultura inibem movimentos de células da crista neural na área em que foram colocadas. PETTWAY e colaboradores (1996) sugerem que a notocorda jovem expressa condroitin sulfato (S103L), podendo assim inibir a migração nessa região em estágios precoces do desenvolvimento. KERR & NEWGREEN (1997) isolaram, caracterizaram, e compararam a estrutura e o efeito de agrecan (um grande agregado do proteoglicano condroitin sulfato extraído de cartilagem adulta e jovem) sobre as células da crista neural. Estes autores observaram que agrecan adicionado à matriz extracelular *in vitro* causa um efeito anti-adesivo e anti-migratório sobre as células da crista neural. Estes resultados apontaram altos níveis de condroitin sulfato em áreas evitadas pelas células da crista neural e sugeriram que estas moléculas podem agir como elemento negativo de controle da migração: uma nova e distinta classe de moléculas morfogenéticas. Então se condroitin sulfato e moléculas ligantes a PNA são inibidores de migração, estão relacionados na demora da entrada das células da crista neural no caminho dorsolateral, permitindo que os precursores de melanócitos sejam especificados antes que iniciem a migração. As mudanças resultantes na especificação de melanoblastos podem então permitir-lhes que sigam o caminho dorsolateral, seja por quimiotaxia, haptotaxia, ou simplesmente por aumento no comportamento invasivo (ERICKSON & GOINS, 1995).

DORSKY e colaboradores (2000) em seu artigo de revisão, relataram a existência de classes de moléculas sinalizadoras que são secretadas: Wnts

(moléculas sinalizadoras que podem controlar diretamente o destino celular em vertebrados e invertebrados), BMP2 e BMP4, e TGFβ1, 2, 3, as quais se mostraram suficientes para especificação de derivados particulares da crista neural. Entretanto, até agora, somente Wnts têm se mostrado necessárias para esta especificação em fases precoces do desenvolvimento. Além disso, podem existir outras moléculas ainda não conhecidas que desempenhem papéis essenciais para este processo, seja sozinhas ou combinadas com os fatores já identificados. De qualquer forma, os sinais Wnt, BMP e TGFβ devem estar presentes antes que as células da crista neural iniciem sua migração, enquanto estas se encontram na chamada MSA ("migration staging area" - uma região entre o tubo neural e a porção mais dorsal do somito), para mediar a especificação do destino celular em crista neural pré-migratória. JIN e colaboradores (2001), usando hibridização *in situ*, notaram que, embora Wnts sejam expressos no tubo neural dorsal do início ao fim do tempo de migração das células da crista neural, o inibidor de Wnt, cfrzb-1, é expresso nos precursores gliais e neuronais e não nos melanoblastos, sugerindo que Wnt pode estar envolvido na especificação da linhagem melanocítica. Estes autores também perceberam que Wnt-3a adicionado ao meio de cultura aumenta muito o número de células pigmentares em cultura de células da crista neural de codorna, enquanto que diminui o número de células neuronais e gliais, sem alterar a proliferação. Já BMP-4 é expresso no tubo neural dorsal enquanto as células da crista neural neuronais estão migrando, mas é reduzido no momento em que está ocorrendo a migração de melanoblastos, sugerindo que sinalizadores BMP podem estar envolvidos na diferenciação celular neuronal e glial ou na repressão da melanogênese. BMP-4 purificado reduz o número de células pigmentares em cultura enquanto aumenta o número de células gliais e neuronais, também sem alterar a proliferação celular. Com estes resultados JIN e colaboradores (2001) sugerem que o sinalizador Wnt especifica melanócitos ao invés das linhagens neuronal e glial, e além disso, que Wnt e BMP têm funções antagônicas na especificação da crista neural do tronco.

Outras moléculas têm sido citadas pelo seu envolvimento na especificação e segregação das células da crista neural, como por exemplo o FoxD3, um membro da classe de fatores de transcrição hélice-alada. KOS e colaboradores (2001)

clonaram o homólogo do FoxD3 de galinha e analizaram sua expressão. Baseados em sua expressão na região dorsal do tubo neural, sugerem que FoxD3 pode ser importante na segregação das células do epitélio neural. Observaram também que células da crista neural melanogênicas não expressam FoxD3. Então testaram se FoxD3 reprime melanogênese em células da crista neural que migram precocemente, através do nocaute da expressão em células da crista neural cultivadas com oligonucleotídeos antisenso e *in vivo* por tratamento com oligonucleotídeos antisenso do tipo morfolinos. Observaram que em ambos os experimentos houve expansão da linhagem melanoblástica, provavelmente às custas das linhagens neuronal e glial. Contrariamente, a expressão persistente de FoxD3 através de vírus RCAS em células da crista neural que migram tardiamente resultou na falha em desenvolver melanoblastos. Com estes resultados os autores sugerem que FoxD3, além de estar envolvido na segregação das linhagens da crista neural do neuroepitélio, reprime melanogênese, por isso permitindo que outros derivados da crista neural se diferenciem durante estágios precoces de padronização da crista neural.

FARACO e colaboradores (2001) através da injeção do corante vital DiI na luz do tubo neural, observaram que em embriões de galinhas Leghorn no estágio 22 a migração ventral de células da crista neural na região do tronco está encerrada, enquanto que em embriões de galinhas Sedosa no mesmo estágio do desenvolvimento, os melanoblastos continuam migrando entre o tubo neural e os somitos. Também observaram a migração de melanoblastos da extremidade distal do espaço dorsolateral para dentro do mesoderma somático e para regiões mais medio-ventrais, se acumulando ao redor da aorta dorsal e ductos mesonéfricos em embriões de galinhas Sedosa, o que coincide com a falta de moléculas ligantes a PNA, nestas regiões no embrião de galinhas Sedosa. Estas moléculas quando estão presentes, podem agir como barreira à migração, e interessantemente foram observadas em embriões de galinhas Leghorn nas regiões destituídas de melanoblastos em migração. Além dessa intensa migração que ocorre em embriões de galinhas Sedosa, as autoras ainda observaram, através da incorporação de BrdU (bromodeoxiuridina), que estes melanoblastos continuam se dividindo, podendo ser a causa da pigmentação interna exagerada observada em galinhas Sedosa.

Células da crista neural das regiões vagal e sacral alcançam o intestino, participando assim da formação dos gânglios entéricos, enquanto que células da crista neural da região do tronco não alcançam regiões mais ventrais (LE DOUARIN & TEILLET, 1973). TUCKER e colaboradores (1986) usando os anticorpos monoclonais NC-1 e E/C8, que reconhecem uma população de células da crista neural, no momento em que elas migram do nível vagal do tubo neural e colonizam a região dos arcos branquiais de embriões de galinha de 2 e 3 dias, observaram que algumas destas células imunorreativas parecem entrar no mesênquima do tubo digestivo no terceiro dia de incubação pela porção caudal à 3ª. fenda branquial. E que após entrar no tubo digestivo, estas células migram numa direção rostro-caudal, usando primeiro o epitélio mesodermal esplâncnico superficial do tubo digestivo como substrato, onde a maioria destas células permanecem associadas com a esplancnopleura. Nos níveis anteriores poucas delas entram no mesênquima ao redor da endoderme enquanto que próximo à região umbilical elas são encontradas por todo o mesênquima, e nos níveis pós-umbilicais estão distribuídas em ambos os lados da camada muscular em diferenciação, mas não dentro desta. Estes autores analizaram também se a distribuição de fibronectina está relacionada com a localização das células imunorreativas, e observaram que, embora a fibronectina possa ser encontrada em toda parede do tubo digestivo, não existe relação aparente com a localização destas células. Com estes resultados os autores sugerem que um mecanismo mais complexo que a mera interação com fibronectina possa contar para migração das células derivadas da crista neural para o tubo digestivo. PETERS-VAN DER SANDEN e colaboradores (1993) através de remoção de diferentes segmentos da crista neural vagal, sugerem que a inervação do intestino posterior *in vivo* depende especificamente da crista neural adjacente aos somitos 3-5, enquanto que a inervação do intestino médio pode ser originada por todos os segmentos dentro da crista neural vagal, e o intestino anterior pode também ser inervado por células de origem fora da crista neural vagal. ROTHMAN e colaboradores (1990) através de enxertos de segmentos de intestino de embriões de codorna no quarto dia do desenvolvimento entre os somitos e o tubo neural na região do tronco de embriões hospedeiros de galinha no segundo dia do desenvolvimento, observaram que células da crista neural (imunomarcadas com

anticorpo monoclonal NC-1 específico para células da crista neural) são capazes de migrar para fora dos segmentos de intestino enxertados e colonizar tubo neural, raiz espinhal e gânglios, nervos periféricos, gânglio simpático e adrenais do embrião hospedeiro. As células do enxerto não migram para o tubo digestivo do embrião hospedeiro e nem produzem pigmento. Estes autores concluíram então que as células derivadas da crista neural, mesmo após já terem inervado o tubo digestivo ainda são capazes de migrar e ainda são multipotentes.

POMERANZ e colaboradores (1991a) usando o corante vital DiI e um retrovírus deficiente na replicação, LZ10, injetados entre tubo neural e ectoderme (antes da migração das células da crista neural) nas regiões vagal, tronco e sacral, confirmaram que as células da crista neural vagal povoam a região anterior do tubo digestivo, sendo encontradas na moela e duodeno. Células da crista neural do tronco não foram encontradas no tubo digestivo, mas foram observadas no gânglio simpático e no gânglio da raiz dorsal, enquanto que as células da crista neural sacral povoam o tubo digestivo pós-umbilical e gânglio de Remak. ROTHMAN e colaboradores (1993) transplantaram células derivadas da crista neural vagal e sacral que já haviam colonizado o intestino anterior, para seus caminhos migratórios iniciais em embriões mais precoces, e observaram que estas células são capazes de remigrar através de caminhos definidos da crista neural nestes embriões hospedeiros.

EPSTEIN e colaboradores (1994) avaliaram a contribuição de diferentes regiões da crista neural vagal para o Sistema Nervoso Entérico, marcando células da crista neural por injeções entre os somitos 1-10 com o vírus vetor da necrose de baço deficiente na replicação, o qual contém o gene marcador lacZ. Após incubação em X-gal, células lacZ-positivas foram encontradas na parede do tubo digestivo em três locais: a maioria foi encontrada à margem periférica do músculo circular em desenvolvimento e dentro da submucosa em desenvolvimento, locais característicos de desenvolvimento de gânglio. Estas células lacZ-positivas nestes locais gangliônicos foram também imunomarcadas pelo HNK-1 confirmando sua origem na crista neural. Células lacZ-positivas foram também vistas na camada de músculo circular do esôfago e papo, e estavam separadas dos elementos gangliônicos HNK-1-positivos, sendo estas células provavelmente células musculares derivadas de

células mesodermais marcadas do somito. As injeções de somitos 3, 4, 5 e 6 resultaram na maior porcentagem de preparações com células derivadas da crista neural lacZ-positivas e no maior número de células positivas no tubo digestivo, sendo estas células encontradas em todas as regiões do tubo digestivo, do proventrículo ao reto. Poucas células positivas derivadas da crista neural foram encontradas no esôfago. As injeções de somitos 1, 2 e 7 resultaram numa menor porcentagem de preparações com células derivadas da crista positivas e num menor número de células derivadas da crista positivas, as quais estavam confinadas ao tubo digestivo anterior e médio. A moela foi a região do tubo digestivo que mais freqüentemente continha células marcadas e o reto a que menos freqüentemente continha estas células, sugerindo que o número de células da crista neural avaliável para colonização do tubo digestivo decresce conforme a distância em relação à moela aumenta. Com estes resultados os autores concluíram que a região do neuroeixo entre somitos 3-6 é a principal fonte de células da crista neural para o tubo digestivo e que células da crista neural de diferentes segmentos do neuroeixo não parecem ser segregadas para diferentes regiões do tubo digestivo.

POMERANZ & GERSHON (1990) separaram as células da crista neural sacral em duas populações, rostral e caudal, através de marcadores neuronais que são expressos somente pela população rostral e não pela população caudal, e observaram que a população rostral chega ao mesênquima dorsal do intestino no quarto dia do desenvolvimento e no quinto dia entra no mesentério e origina o gânglio de Remak. A população caudal parece ascender dentro do cólon e reto e, em contraste com as células rostrais, envolve totalmente o tubo digestivo. Estas células que não expressam os marcadores neuronais parecem ser capazes de originar neurônios *in vitro*, explicando o desenvolvimento de neurônios em explantes das metades ventrais do tubo digestivo.

BURNS & LE DOUARIN (1998), através de enxertos quimera codorna/galinha em conjunto com marcação por anticorpos para identificar células derivadas do enxerto (QCPN), neurônios (ANNA-1) e glia (GFAP), mostraram que células da crista neural vagal e sacral seguem caminhos de migração muito precisos no desenvolvimento do tubo digestivo de embrião de ave, que células da crista neural vagal migram numa direção próximo-distal (ou rostro-caudal), colonizando todo o

comprimento do tubo digestivo, enquanto que células da crista neural sacral migram numa direção distal-proximal (ou caudal-rostral) formando o nervo de Remak e contribuindo com neurônios e glia do Sistema Nervoso Entérico, distal ao umbigo. Além disso, mostraram que o colo-reto é povoado de modo complexo por células derivadas da crista vagal que primeiro colonizam a região submucosal, então migram por fora através da camada muscular circular para a região do plexo mientérico, enquanto que células da crista neural sacral entram no colo-reto externas à camada de músculo circular ao nível do plexo mientérico e subseqüentemente migram para dentro do gânglio submucosal, assim sendo, dentro do colo-reto, células de duas regiões distintas da crista neural migram em direções opostas para formar o gânglio entérico.

BURNS e colaboradores (2000), através de remoção de diferentes segmentos da crista neural vagal, observaram que precursores derivados da crista neural sacral colonizam o intestino em número significante somente quatro dias após as células derivadas da crista neural vagal terem completado sua migração ao longo de todo o intestino, sugerindo que o destino da subpopulação de células da crista neural sacral pode ser predeterminado pela necessidade da presença de precursores entéricos derivados da crista neural vagal como uma condição para colonizar o intestino posterior, sendo estes capazes de alterar dramaticamente a proliferação ou diferenciação das células de origem sacral. Estes autores sugerem ainda que esta interdependência pode também explicar a inabilidade de células da crista neural sacral em compensar a falta de gânglio na região terminal do intestino posterior na doença de Hirschsprung em humanos ou no megacolon agangliônico em animais. GERSHON e colaboradores (1993), através de imunocitoquïmica, observaram que uma superabundância de laminina desenvolve uma região agangliônica do tubo digestivo em camundongos mutantes ls/ls e está associada com a inabilidade de células derivadas da crista neural para colonizar esta região do tubo digestivo, conduzindo à hipótese de que a laminina promove a diferenciação das células da crista neural em neurônios entéricos. A expressão prematura de um fenótipo neuronal pode causar encerramento da migração das células da crista neural antes que elas completem a colonização do tubo digestivo.

ERICKSON & GOINS (2000), através de transplantes de células cultivadas com marcação fluorescente (fluor-gold), mostraram que células da crista neural sacral, quando enxertadas na região do tronco, migram até o mesentério dorsal e não entram no intestino. Já células dos níveis sacral e torácico, quando enxertados no nível sacral, alcançam o mesênquima do intestino. Concluíram, então, que células da crista neural sacral não apresentam propriedades migratórias especiais que lhes permitam alcançar o intestino, e sim que o ambiente aos níveis vagal e sacral é condutivo para alcançar o intestino e que células da crista neural de todos os níveis axiais são responsivas a estes fatores ambientais. Em contraste à migração de melanoblastos, cuja migração por caminhos apropriados é dependente da especificação anterior da linhagem e propriedades migratórias próprias desta linhagem (ERICKSON & REEDY, 1998). ERICKSON & GOINS (2000) evidenciaram que as células da crista neural que entram no intestino, o fazem devido a características estruturais da região sacral que permitem a rápida migração ventral, fato que pode estar combinado com a existência de uma barreira para a migração ao nível torácico, que impede que células da crista neural migrem para regiões abaixo da aorta dorsal. Essas autoras sugerem, então, duas condições ambientais que favorecem a migração ventral ao nível sacral. A primeira é que células da crista neural sacral tomam um caminho ventral preferivelmente ao caminho medial-lateral através dos somitos e conseqüentemente chegam ao mesênquima do intestino muitas horas antes que as células da crista neural ao nível torácico. Há somente uma estreita janela de oportunidade para a invasão do mesênquima do mesentério e do intestino, de modo que a chegada precoce garante às células da crista neural ganhar acesso ao intestino. A segunda é que o endoderma do intestino é mais dorsalmente situado ao nível sacral que ao nível torácico, portanto células da crista neural sacral tomam um caminho mais direto para o intestino. Além disso, ao nível torácico sugerem que possa existir uma barreira de migração evitando que as células da crista neural migrem para a região ventral à aorta dorsal e para dentro do mesentério, o qual é o portal para o intestino. FAIRMAN e colaboradores (1995) usando um anticorpo que reconhece proteínas específicas RNA-ligantes neuronais da família Hu (ANNA-1) como um marcador precoce de fenótipo neuronal, para estudar a aparição de neurônios entéricos no tubo digestivo de embriões de

galinha, concluíram que a aparição de neurônios ocorre primeiro na moela e prossegue mais rapidamente numa direção distal que proximal ao longo do tubo digestivo. Além disso, observaram células que parecem ser neurônios no vago e no mesentério dorsal. KRULL e colaboradores (1995), tratando explantes de regiões do tronco de embriões de galinha com PNA notaram que houve redução na velocidade de migração (de 10-14 μm/hora para 6-13 μm/hora) e alteração no padrão de migração da crista neural. Com estes resultados sugerem que moléculas ligantes a PNA são requeridas para o padrão segmentado de migração da crista neural do tronco.

Acreditava-se que para que células da crista neural sacral colonizassem o tubo digestivo era necessário que as células da crista neural vagal já o tivessem realizado. HEARN & NEWGREEN (2000) testaram esta idéia combinando tubo digestivo médio e tubo digestivo posterior de embrião de galinha E4, isolando precursores neurais que chegaram antes, com tubo neural como doador de crista vagal de embrião de galinha E1.7 e/ou da crista lombo-sacral de embrião de codorna E2.7 e enxertando estes para a membrana cório-alantóica de embriões de galinha hospedeiros E9. Usando dupla e tripla imunomarcação para células de codorna (QCPNA), células da crista neural (HNK-1), neurônios e neuritos (neurofilamentos) e células gliais (GFAP) observaram que células da crista vagal produziram neurônios e glia em grande gânglio por todos os tecidos intestinais e que a crista lombo-sacral contribuiu para pequeno número de neurônios e células gliais na presença ou ausência de células vagais, principalmente no colo-reto. Com estes resultados, HEARN & NEWGREEN (2000) sugerem que para a produção de células neurais entéricas a crista neural lombo-sacral de ave não requer a crista neural vagal, nem compensa significantemente sua falta, sendo assim a neurogênese entérica de células lombo-sacrais requer o microambiente do tubo digestivo posterior, enquanto que células vagais não são restritas a uma região particular do intestino.

Se as células da crista neural não alcançam os órgãos ventrais na região do tronco, é possível a existência de moléculas da matriz extracelular, entre elas as que são ligantes a aglutinina de amendoim (PNA), que possam estar formando uma barreira e inibindo esta migração. Desta forma é de extrema relevância o estudo e

identificação de tais moléculas, na tentativa de elucidar os mecanismos de direcionamento desta linhagem celular. O povoamento de regiões ventrais por células da crista neural se dá nos estágios de desenvolvimento em que os precursores de melanócitos ainda não iniciaram sua migração. A observação de presença de células de linhagem melanocítica em vísceras e membranas conjuntivas de galinhas Sedosas japonesas, levanta a questão do momento de seu aparecimento e trajeto migratório. Como já descrito (REEDY *et al.* 1998a) estas células de Sedosa parecem percorrer tanto a via dorsolateral como a ventral, mas em estágios mais avançados, quando o povoamento do tubo digestivo já ocorreu. A comparação de distribuição de moléculas da matriz extracelular em raças com diferentes padrões de pigmentação e em diferentes estágios de desenvolvimento se faz necessária para que se possa esclarecer melhor a participação dos fatores ambientais no processo de migração e diferenciação das células da crista neural.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- analisar a participação de moléculas ligantes a PNA:
  - no trajeto ventral das células da crista neural nos três níveis axiais (vagal, tronco e sacral) em ambas as linhagens de aves (Leghorn e Sedosa brancas);
  - e no trajeto dorsolateral ao nível do tronco nas diferentes fases desta migração em ambas as linhagens de aves: Leghorn branca, a qual apresenta padrão normal de migração de melanoblastos e Sedosa branca, cuja migração de melanoblastos é alterada.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção dos embriões

Foram utilizados ovos embrionados de galinhas (*Gallus gallus*) das raças Leghorn e Sedosa japonesa, fornecidos pelo aviário da Fazenda Experimental da UFPR, os quais foram incubados a 38°C, em incubadora umidificada e com aeração, até que atingissem os estágios 11, 16-17, 18-19 e 20-21, e 18, 20, 22, 24, 26 e 28 do desenvolvimento (HAMBURGER & HAMILTON, 1951). Os embriões foram removidos de suas cascas, colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS), estagiados e em seguida seccionados com agulhas de tungstênio nas regiões vagal (somitos 2 a 7 - embriões no estágio 11 e 16/17), do tronco (somitos 18 a 23 - embriões no estágio 16/17 e 18/19) e sacral (somitos 28 a 33 - embriões no estágio18/19 e 20/21), e somente região do tronco, no nível do broto da asa para embriões nos demais estágios (18, 20, 22, 24, 26 e 28).

3.2- Fixação

Os segmentos de embriões foram fixados por 1 hora em solução Bouin e depois lavados e armazenados em etanol 70%.

3.3- Inclusão em Paraplast e microtomia

Após a desidratação em série crescente de etanol 70, 80, 95 e 100%, os segmentos de embriões foram incluídos em Paraplast (Fischer), e então cortados

transversalmente na espessura de 6 μm em micrótomo Minot. Os cortes, em seqüência da região mais anterior para a mais posterior, foram montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram guardadas em geladeira (a 4°C) até sua utilização.

3.4- Detecção de açúcares nos cortes em Paraplast

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 56°C por 1 hora, banhados em xilol por mais 1 hora e reidratados em série decrescente de etanol (100, 95, 70 e 50%) e água destilada por 5 minutos em cada solução. Então os cortes foram lavados 2 vezes em PBS e uma vez em PBS + glicina 0,1 M por 5 a 10 minutos cada banho e bloqueados em uma solução de soro de cabra 2% em BSA 0,5% por 15 minutos, incubados em aglutinina de amendoim conjugada diretamente com fluoresceína (PNA-FITC) (OAKLEY *et al.*, 1994) (Vector cat#FL-1071) na concentração de 1:200 em tampão *bloqueador* à temperatura ambiente em câmara úmida, lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos e montados com meio de montagem para fluorescência, e observadas imediatamente ou estocadas na ausência de luz, a 4°C para posterior análise e tomada fotográfica em microscópio de epifluorescência Axiophot (Zeiss) com filtro de fluoresceína. Lâminas controle foram banhadas em galactose 200 mM para inibição dos radicais de açúcares, previamente ao tratamento com a aglutinina de amendoim (PNA).

3.5- Detecção das células derivadas da crista neural nos cortes em paraplast.

Em algumas das amostras (lâminas), além da marcação pelo PNA, também foi realizada a imunomarcação com HNK-1 para detecção de células derivadas da crista neural.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 56°C por 1 hora, banhados em xilol por mais 1 hora e reidratados em série decrescente de etanol (100, 90, 70 e 50%) e água destilada por 5 minutos em cada solução. Então os cortes foram lavados 3 vezes em PBS por 5 a 10 minutos cada banho e bloqueados em PBS + BSA 1% por 15 minutos, incubados no anticorpo primário (sobrenadante de hibridoma HNK-1, gentilmente cedido pela Dra. Carol A. Erickson) "over-night" em câmara úmida na geladeira à 4°C. Após incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos cada banho, incubados no anticorpo secundário (anti-IgM de camundongo conjugado com rodamina da Chemicon, Temecula, CA) na concentração de 1:100 em PBS por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente, lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos cada banho e montados com meio de montagem para fluorescência, e observados imediatamente ou estocados na ausência de luz, à 4°C para posterior análise e tomada fotográfica em microscópio de epifluorescência Axiophot (Zeiss) com filtro de rodamina. Nas lâminas controle não foi aplicado o anticorpo primário (HNK-1).

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Marcação de glicoconjugados da matriz extracelular ligantes a PNA em embriões de galinhas Leghorn branca e Sedosa branca no trajeto de migração ventral das células da crista neural em diferentes níveis axiais:

Através da histoquímica pela lectina PNA, a qual detecta açúcares galactose-N-acetilgalactosamina de glicoconjugados de matriz extracelular ou de superfície celular, em cortes histológicos de embriões de galinhas Leghorn branca (Lb) e Sedosa branca (Sb), nas regiões:

- vagal (somitos 2 a 7) de embriões nos estágios 11 e 16/17;
- do tronco abaixo do broto da asa (somitos 18 a 23) de embriões nos estágios 16/17 e 18/19 e
- sacral ao nível do broto da perna (somitos 28 a 33) de embriões nos estágios 18/19 e 20/21

pôde-se observar que as células da crista neural são capazes de migrar por regiões onde a marcação por PNA esteve fraca ou quase ausente. As marcações nas regiões correspondentes ao caminho ventral se apresentaram com gradiente de intensidade, estando mais intensa na região perinotocordal e ficando menos intensa, algumas vezes praticamente ausente, nas proximidades dos somitos. Observou-se também que a lâmina basal do tubo neural sempre esteve marcada positivamente pela PNA, exceto na porção mais dorsal, que em alguns momentos esteve fracamente marcada.

Não foram observadas diferenças nos padrões de marcação do mesentério dorsal, o qual se apresentou livre da marcação nos três níveis axiais dos estágios analisados.

A imunomarcação, pelo anticorpo HNK-1, das células derivadas da crista neural foi utilizada para confirmação do padrão anteriormente descrito para a distribuição das células em migração ventral.

Nos controles negativos, tanto para marcação pela PNA como para marcação pelo HNK-1, não foi observada emissão de fluorescência.

4.1.1- Região vagal (somitos 2-7) de embriões no estágio 11:

Tanto em embriões de Lb como Sb a marcação positiva para PNA foi observada ocupando toda a via dorsolateral, estando intensa na MSA. Em embriões de Lb toda porção ventral foi marcada, sendo mais intensa ao redor da notocorda. Já em embriões de Sb somente o espaço perinotocordal se apresentou marcado. A região dos somitos esteve fracamente marcada em embriões de ambas as raças (Fig. 1a e 1b).

4.1.2- Região vagal (somitos 2-7) de embriões no estágio 16/17:

Foi observada positividade intensa para PNA ao redor da notocorda e um decréscimo nessa intensidade nas proximidades dos somitos, tanto em embriões de Lb como Sb. Nas laterais da aorta dorsal e mesentério dorsal observou-se positividade fraca em embriões de Sb e Lb. A porção dorsal ao tubo neural, a MAS e o início do caminho dorsolateral apresentaram positividade fraca para PNA, enquanto que a positividade começou a aparecer no caminho dorsolateral na altura mediana dos somitos e se intensificou na região mais ventral desse caminho em ambas as raças (Figs. 2a e 2b).

Foi possível a observação do gânglio de raíz dorsal, confirmando a localização do corte na porção anterior do somito (por onde as células da crista

neural migram), e células HNK-1 positivas localizadas próximas à aorta dorsal e ao tubo digestivo.

4.1.3- Região do tronco, abaixo do broto da asa (somitos 18-23), de embriões no estágio 16/17:

A marcação positiva pela PNA esteve presente e muito intensa no caminho dorsolateral bem como na MSA, e menos intensa dorsalmente ao tubo neural. O caminho ventral esteve marcado mas com certo gradiente de intensidade, tendo a região perinotocordal marcação muito intensa, sendo a região próxima ao somito bem menos marcada. Foi possível a observação de células positivas para HNK-1 nas regiões em que a intensidade da marcação por PNA foi menor. As células se distribuem entre o tubo neural e o somito, acompanhando o miótomo e atinjindo o esclerótomo (Figs. 3a e 3b). A lâmina basal do tubo neural esteve marcada fortemente, com exceção da porção mais dorsal. A entrada para o tubo digestivo (mesentério dorsal) se apresentou livre de marcação. Esse padrão de marcação foi bastante similar para as duas raças em questão.

4.1.4- Região do tronco, abaixo do broto da asa (somitos 18-23), de embriões no estágio 18/19:

O caminho dorsolateral se apresentou intensamente marcado pela PNA, estando a região dorsal ao tubo neural e a MSA menos marcadas. Os somitos não apresentaram marcação positiva e toda a região do caminho ventral, entre tubo neural e somitos, e ao redor da notocorda apresentaram-se mais fracamente marcados se comparados com o caminho dorsolateral, apresentando gradiente de intensidade. A região ventral à aorta dorsal não apresentou marcação (Fig. 4a). Foram observadas células HNK-1 positivas no início do caminho ventral, entre o

tubo neural e o somito (região do gânglio de raiz dorsal) e aos lados da aorta dorsal (Fig. 4b). Novamente o padrão de marcação foi muito similar para as duas raças.

4.1.5- Região sacral (somitos 28-33) de embriões no estágio 18/19:

Marcação intensa pela PNA foi observada no caminho dorsolateral e MSA. Dorsalmente ao tubo neural a marcação foi bem menos intensa. A lâmina basal do tubo neural foi bem marcada com exceção da porção mais dorsal. A via ventral, entre o tubo neural e o somito, bem como a endoderme apresentaram-se mais fracamente marcadas. Novamente se observou o gradiente de intensidade na via ventral como já descrito (Fig. 5a). Foram observadas células positivas para o HNK-1 na via ventral em áreas de marcação menos intensa pela PNA. As células distribuem-se pelo esclerótomo desde a região próxima ao miótomo até a altura da aorta dorsal. Já existe um grupo de células formando o gânglio de raiz dorsal (Figs. 5b e 5c). Não foram observadas diferenças significativas nos padrões de marcação entre as duas raças.

4.1.6- Região sacral (somitos 28-33) de embriões no estágio 20/21:

O caminho dorsolateral esteve marcado positivamente, mas se comparado com o estágio anterior, notou-se uma redução na intensidade da marcação nas duas raças. O caminho ventral apresentou-se mais uniformemente marcado em embriões de Lb, já em embriões de Sb este caminho se apresentou com gradiente de intensidade de marcação. Ventralmente à aorta dorsal foram observados apenas traços da marcação tanto em embriões de Lb como Sb (Figs. 6a e 6b). Células HNK-1 positivas foram observadas formando o gânglio de raiz dorsal e na via de migração ventral, distribuindo-se paralelamente ao miótomo, atinjindo o esclerótomo e chegando até a altura da aorta dorsal (Fig. 6c).

4.2- Marcação de glicoconjugados da matriz extracelular ligantes a PNA em embriões de galinhas Leghorn branca (Lb) e Sedosa branca (Sb) nas diferentes fases da migração dorsolateral das células da crista neural na região do tronco ao nível do broto da asa (somitos 10-17):

A marcação pela lectina PNA juntamente com a imunomarcação de células da crista neural pelo anticorpo HNK-1, na região do tronco ao nível do broto da asa (somitos10 a 17), de embriões de galinhas Lb e Sb nos estágios 18, 20, 22, 24, 26 e 28, permitiu a observação de diferentes padrões de intensidade de marcação de glicoconjugados da matriz extracelular ligantes a PNA nas fases distintas da migração dorsolateral das células da crista neural na região do tronco. Observou-se que nesta região ocorreu uma redução gradual na intensidade da marcação à medida que aumentou a idade do embrião. O caminho dorsolateral no estágio 18 apresentou marcação positiva e conforme o desenvolvimento embrionário avançou, esse caminho foi se tornando gradualmente livre da marcação.

4.2.1- Embriões no estágio 18:

Foi observada marcação positiva no caminho dorsolateral e traços de marcação dorsalmente ao tubo neural e MSA. No espaço perinotocordal a marcação foi intensa, já próximo ao somito a marcação foi fraca (novamente formando gradiente de intensidade). Na região ao redor da aorta dorsal e início do mesentério dorsal, forte marcação pela PNA foi visualizada (Fig. 7). O nível axial aqui observado é o do broto da asa, alguns somitos anteriores ao nível descrito anteriormente para o estágio 18/19, onde não se observou marcação nessa região (ver fig. 4a). Células HNK-1 positivas foram observadas formando o gânglio de raiz dorsal e outras estruturas como raízes dorsal e ventral e nervo periférico, relacionadas com a onda de migração anteriormente ocorrida pela via ventral, não chegando até as áreas agora fortemente PNA positivas. Na região dorsal ao tubo neural, MSA e entrada da via dorsolateral havia células HNK-1 positivas. Não foram

observadas diferenças significativas entre as duas raças neste estágio do desenvolvimento.

4.2.2- Embriões no estágio 20:

A marcação esteve muito forte no espaço perinotocordal e ao redor da aorta dorsal, exceto ventralmente à aorta dorsal e mesentério dorsal, onde a marcação foi fraca ou quase ausente. Na região dorsal ao tubo neural e até a metade do caminho dorsolateral a marcação foi muito fraca ou quase ausente, bem como no somito e na mesoderme que se estende da extremidade ventral do somito até o broto da asa. No restante do caminho dorsolateral, entre a ectoderme e o somito e broto da asa, observou-se marcação positiva pela PNA (Fig. 8a). Células HNK-1 positivas foram observadas formando estruturas do Sistema Nervoso Periférico relacionadas com a migração ventral, que aconteceu anteriormente. Também observou-se células HNK-1 positivas avançando pelo caminho dorsolateral (Fig 8b). Os padrões de distribuição e intensidade da marcação pela PNA foram os mesmos para embriões de Lb e Sb.

4.2.3- Embriões no estágio 22:

Marcação muito fraca (quase ausente) no caminho dorsolateral até a região do início do broto da asa. O espaço ao redor da notocorda e dorsal à aorta dorsal, bem como a região dos ductos mesonéfricos apresentaram-se marcados, sendo que em embriões Lb esta marcação foi mais intensa se comparados com embriões de Sb nesse mesmo estágio (Figs. 9a e 9b). A região compreendida entre tubo neural, gânglio de raiz dorsal e somito se apresentou completamente negativa à marcação pela PNA, bem como toda região do embrião ventral à aorta dorsal. Foram observadas células HNK-1 positivas na via dorsolateral, e formando os gânglios de

raiz dorsal, as raízes dorsal e ventral e os gânglios simpáticos (aos lados da aorta dorsal). Em embriões de Sb foram observadas algumas células HNK-1 positivas na porção ventral à aorta dorsal, já em embriões de Lb não havia células HNK-1 positivas nessa região, elas se encontravam apenas nas laterais da aorta dorsal (Fig. 9c e 9d)

4.2.4- Embriões no estágio 24:

A marcação por PNA em embriões de Lb se manteve no mesmo padrão observado em embriões de Lb do estágio anterior, e em embriões de Sb observou-se uma redução da marcação na região ventral (Figs. 10a e 10b). As células HNK-1 positivas apresentaram-se na mesma distribuição descrita para embriões do estágio anterior.

4.2.5- Embriões no estágio 26:

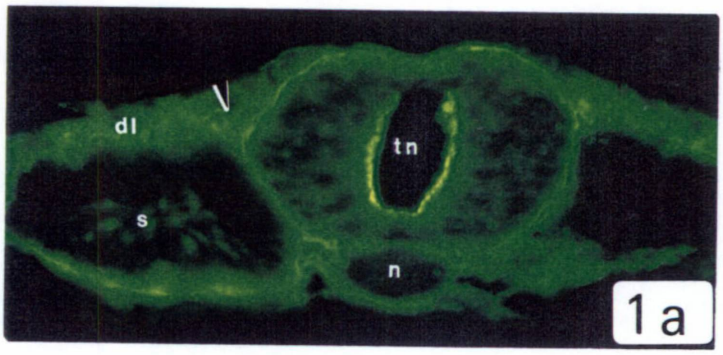
Nesse estágio ao nível do tronco observou-se um aumento na intensidade da marcação em embriões de Lb se comparados com embriões no estágio anterior, enquanto que em embriões de Sb a intensidade da marcação foi a mesma ou menor se comparados com embriões no estágio anterior (Figs. 11a e 11b). Em embriões de Lb notou-se uma faixa de marcação pela PNA entre o gânglio de raiz dorsal e o somito preenchendo toda a via ventral de migração. Do final do somito estende-se uma faixa acompanhando a raiz ventral e bloqueando os limites entre os caminhos ventral e dorsolateral. E em embriões de Sb entre o gânglio de raiz dorsal e o somito observou-se apenas traços da marcação. As células HNK-1 positivas foram observadas formando as estruturas do Sistema Nervoso Periférico em embriões das duas raças, e em embriões de Sb observou-se células migrando em direção ao nervo periférico, parecendo ser células desviadas do caminho dorsolateral (Fig.

11c), além de células HNK-1 positivas migrando ventralmente, quando em embriões de Lb estas células estão migrando somente pela via dorsolateral, dirigindo-se para o broto da asa.

4.2.6- Embriões no estágio 28:

Os embriões de Lb apresentaram marcação positiva no espaço entre somito e gânglio da raiz dorsal, na extremidade ventral do somito e na área que conecta o caminho dorsolateral à região ventral do embrião. Não foram observadas células da crista neural nessa região nem na via ventral em embriões de Lb. E em embriões de Sb observou-se pouca marcação pela PNA entre o gânglio da raiz dorsal e o somito, existindo um caminho livre de marcação bem próximo ao gânglio. No espaço perinotocordal não houve marcação positiva, havendo também uma região no final do somito livre de marcação em embriões de Sb (Figs. 12a e 12b). Novamente pôde-se observar células HNK-1 positivas no trajeto entre caminho dorsolateral e ventral passando próximas às raízes ventrais em embriões de Sb, parecendo células que se desviaram do caminho dorsolateral para povoar regiões ventrais do embrião (Figs. 12c, 12d).

5- FIGURAS



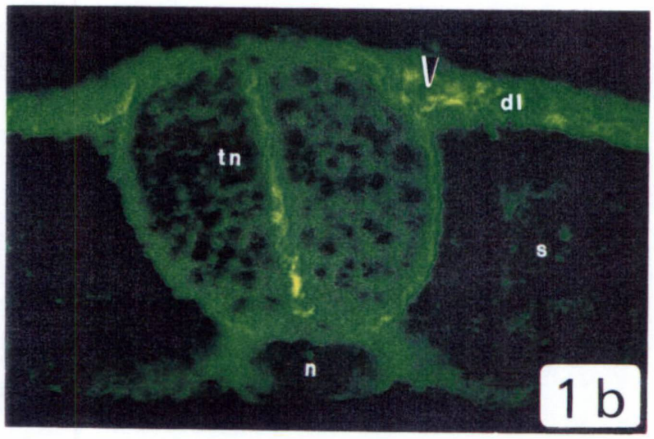


Fig. 1- Corte transversal de região vagal de embriões no estágio 11 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (400X) e **(b)** embrião de Sb (400X). Observar marcação positiva em toda via dorsolateral e intensa marcação na MSA. tn= tubo neural; n= notocorda; s= somito; dl= via dorsolateral; cabeça de seta= MSA.

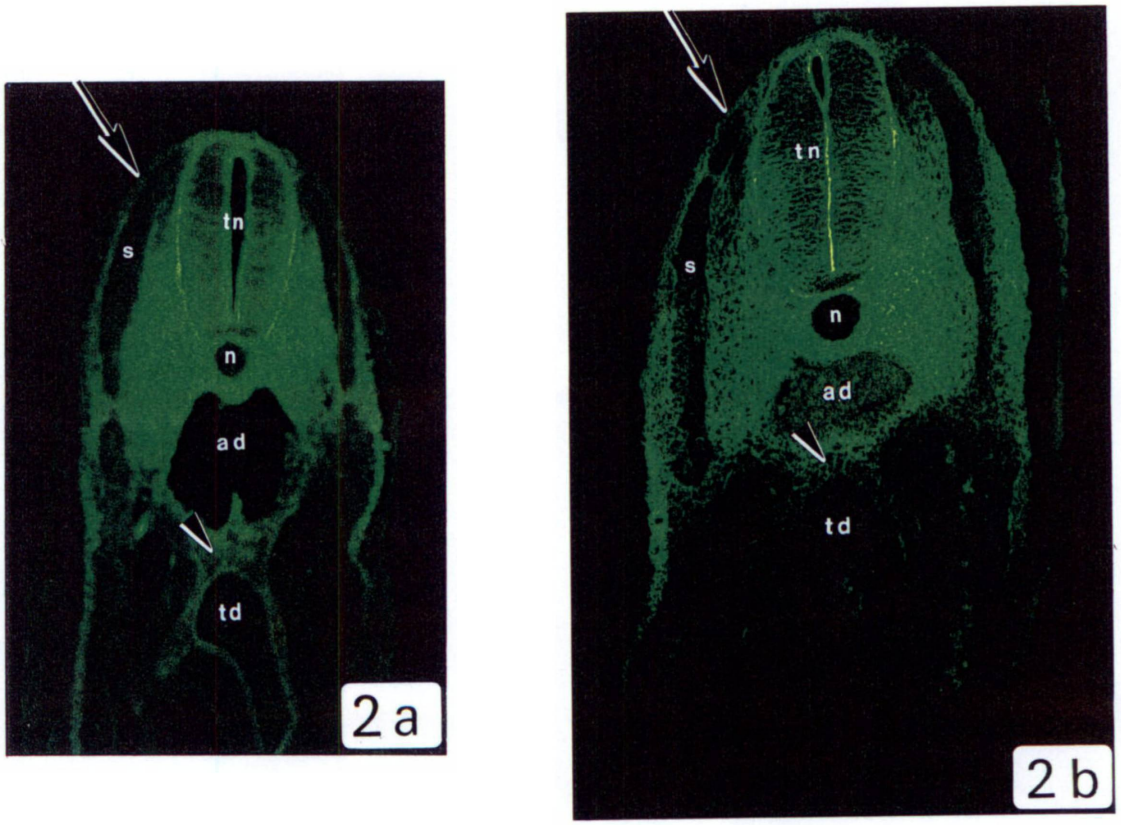


Fig. 2- Corte transversal de região vagal de embriões no estágio 16/17 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (100X) e **(b)** embrião de Sb (100X). Observar gradiente de marcação na região entre notocorda e somito e fraca marcação no início da via dorsolateral. tn= tubo neural; n= notocorda; s= somito; ad= aorta dorsal; td= tubo digestivo; seta= via dorsolateral; cabeça de seta= mesentério dorsal.

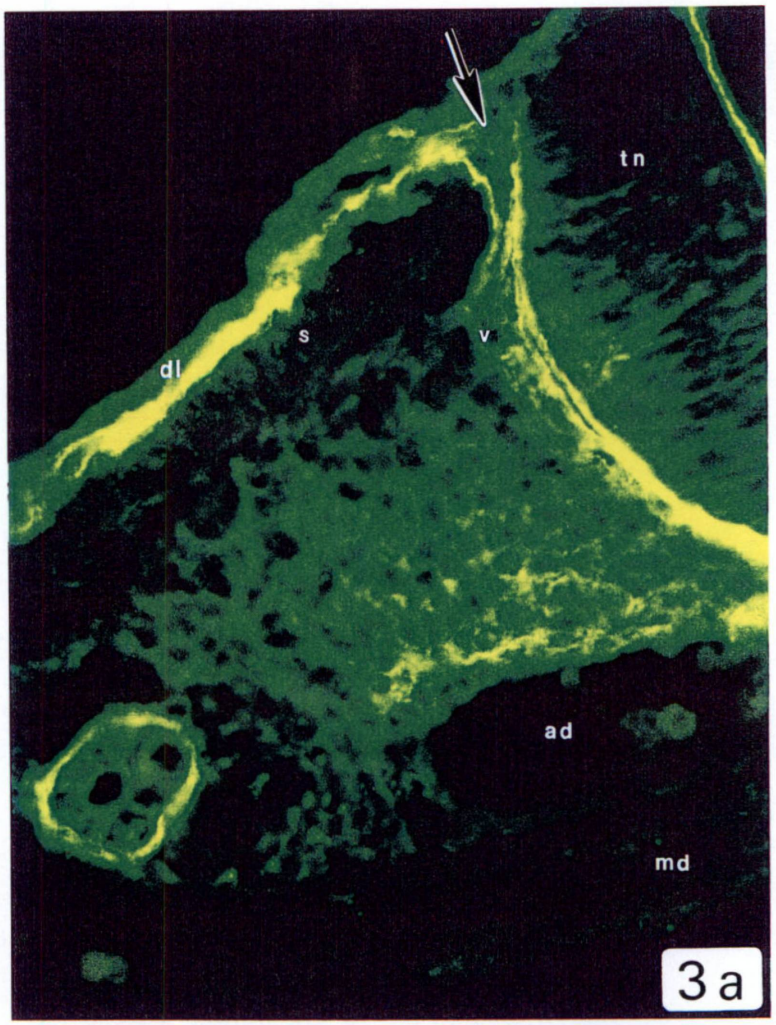


Fig. 3- Corte transversal de região do tronco de embrião de Sb no estágio 16/17 (HH). **(a)** com marcação pela PNA (400X). Observar gradiente de marcação na via ventral e marcação intensa na via dorsolateral. tn= tubo neural; s= somito; dl= via dorsolateral; v= via ventral; ad= aorta dorsal; md= mesentério dorsal; seta= MSA.

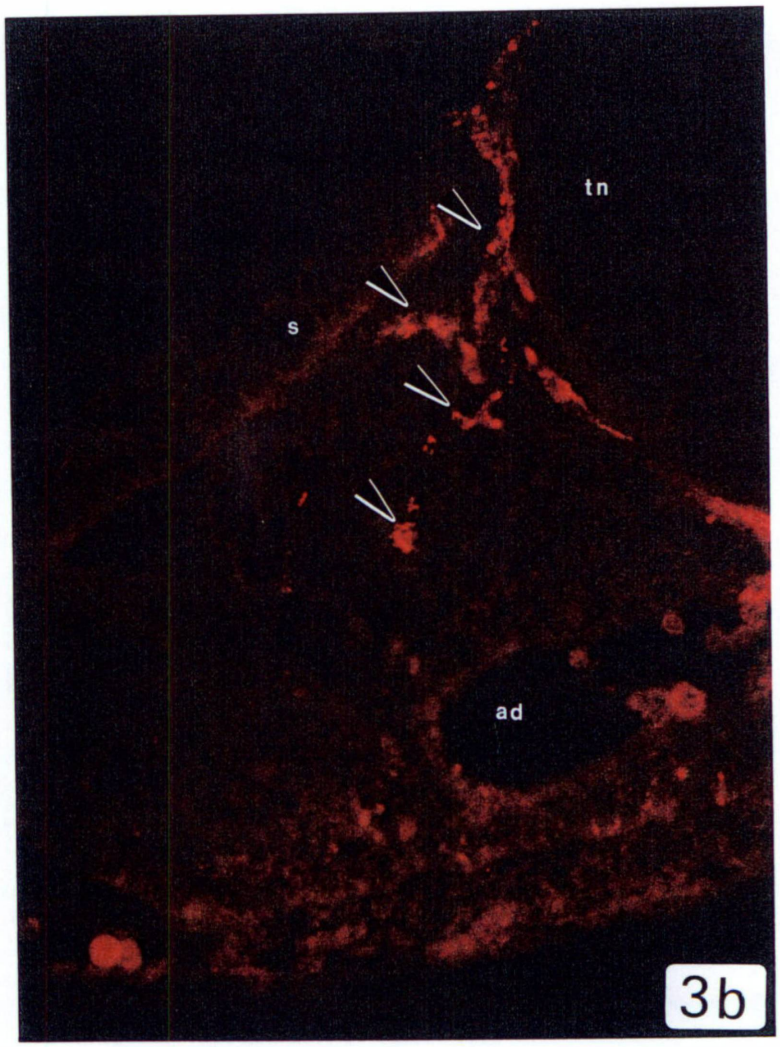


Fig. 3 (b) com imunomarcação pelo HNK-1 (400X). Observar células HNK-1 positivas ocupando a região correspondente à via de migração ventral. tn= tubo neural; s= somito; ad= aorta dorsal; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

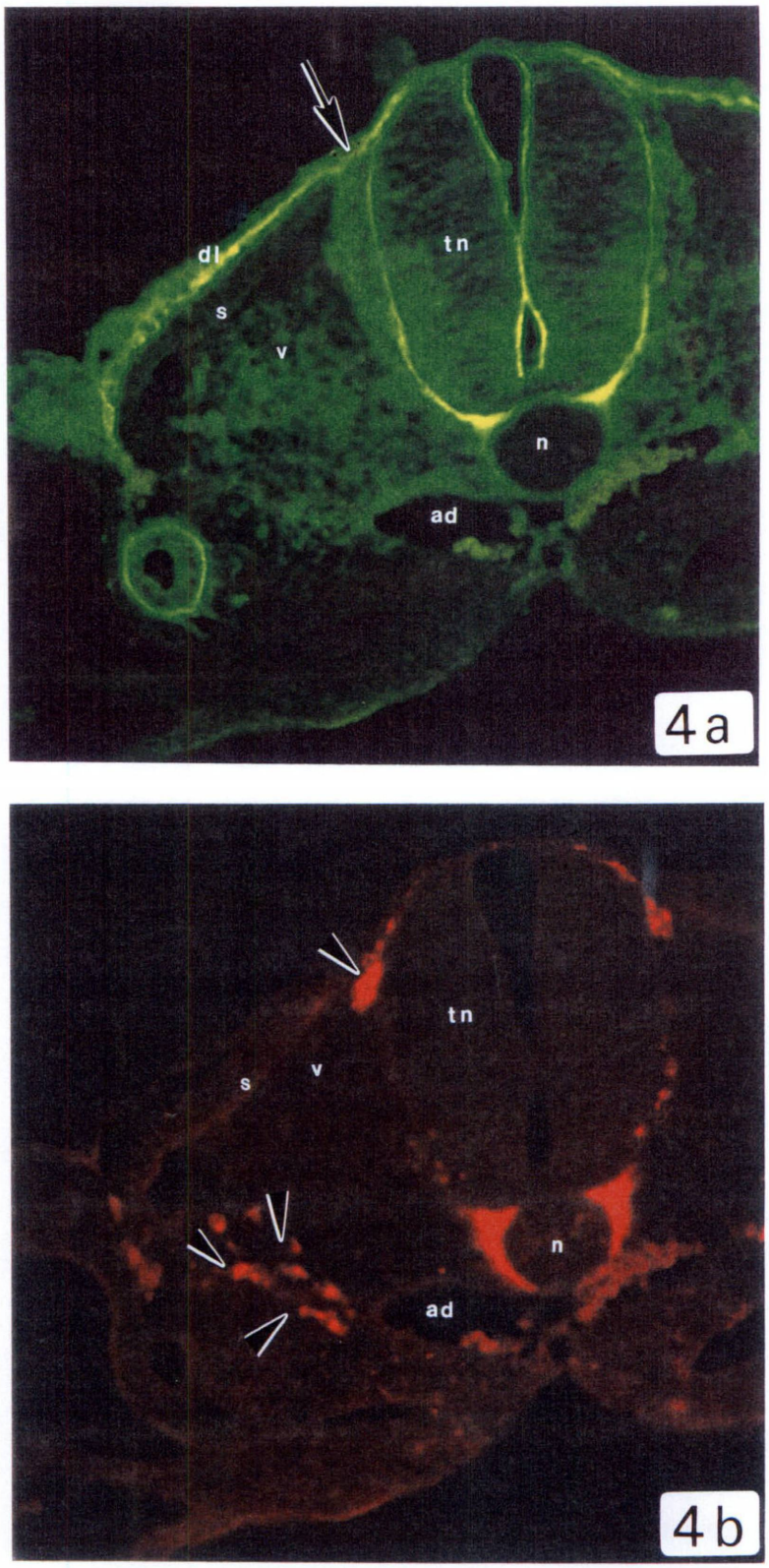


Fig. 4- Corte transversal de região do tronco de embrião de Lb no estágio 18/19 (HH). **(a)** com marcação pela PNA (200X) e **(b)** com imunomarcação pelo HNK-1 (200X). Observar intensa marcação na via dorsolateral, fraca marcação na via ventral e células HNK-1 positivas ocupando a região correspondente ao início da via ventral e aos lados da aorta dorsal. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; v= via ventral; n= notocorda; ad= aorta dorsal; seta= MSA; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

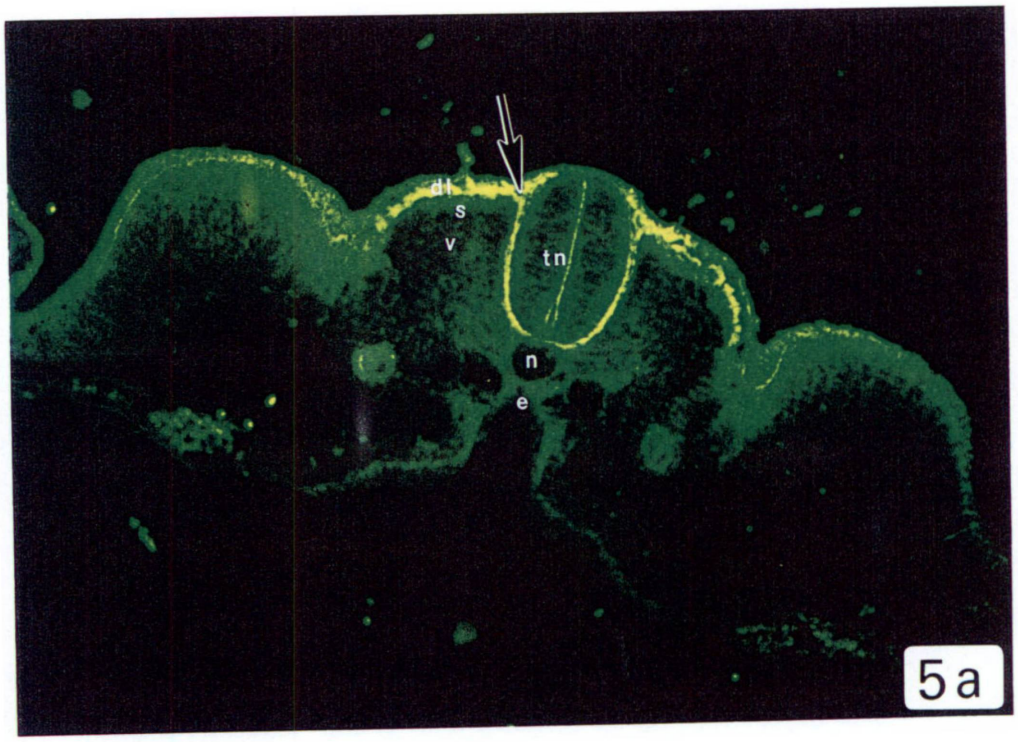


Fig. 5- Corte transversal de região sacral de embriões no estágio 18/19 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X). Observar via dorsolateral e MSA intensamente marcadas, e via ventral apresentando gradiente de marcação. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; v= via ventral; n= notocorda; e= endoderme; seta= MSA.

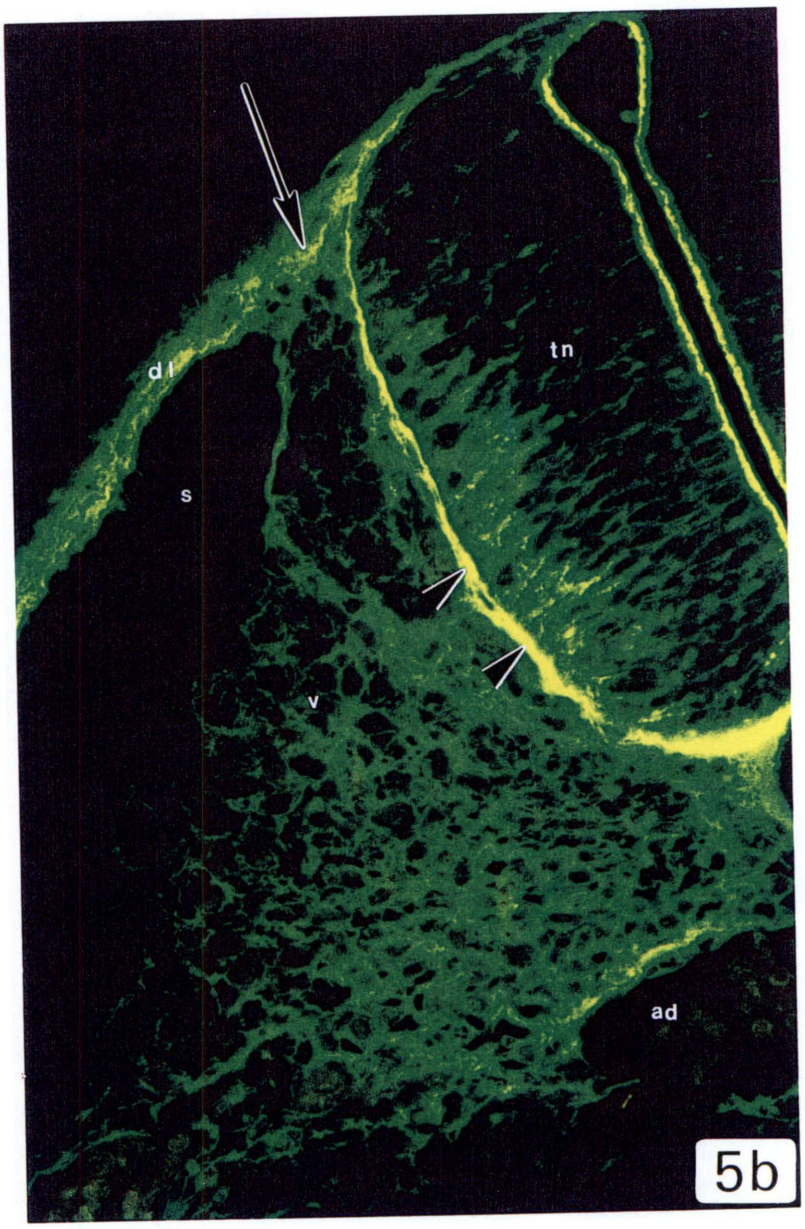


Fig. 5 (b) embrião de Sb com marcação pela PNA (400X). Observar gradiente de marcação na via ventral e lâmina basal do tubo neural intensamente marcada, exceto na porção mais dorsal. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; v= via ventral; ad= aorta dorsal; seta= MSA; cabeças de seta= lâmina basal do tubo neural.

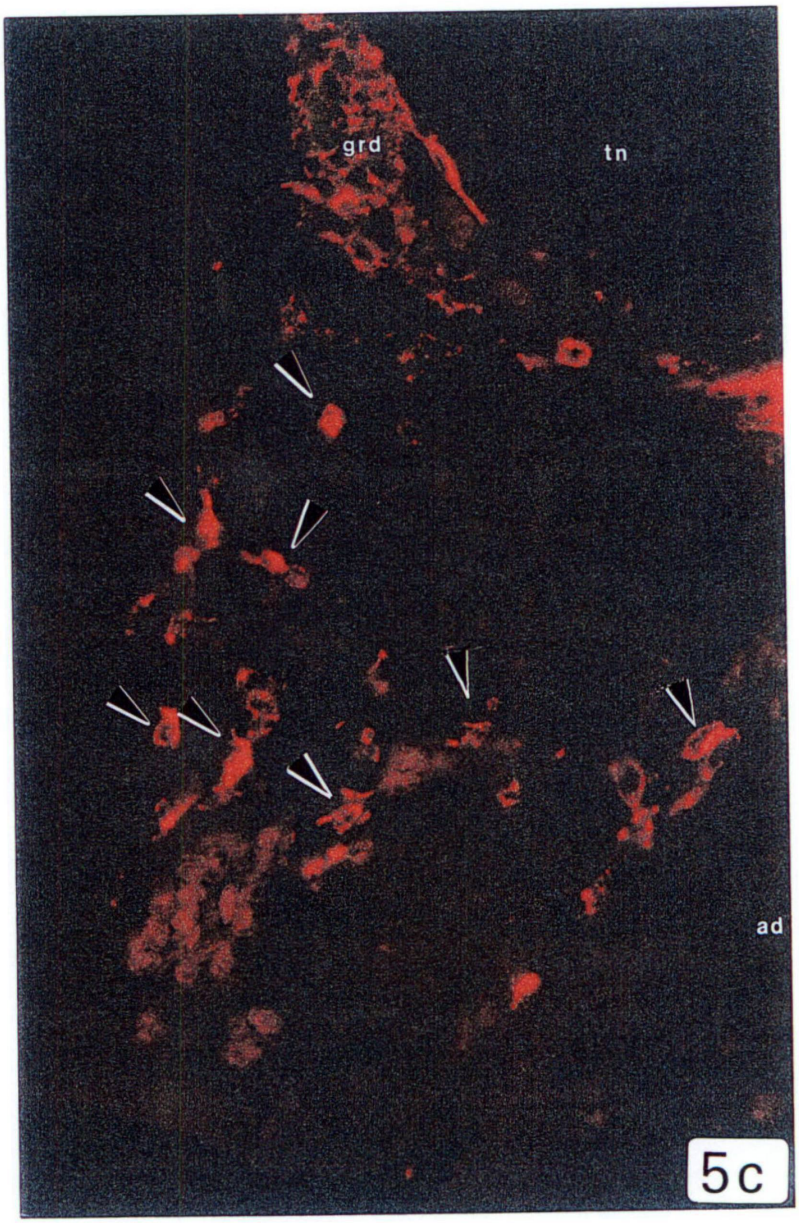


Fig. 5 (c) embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X). Observar células HNK-1 positivas ocupando a região correspondente à via ventral de migração. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; ad= aorta dorsal; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

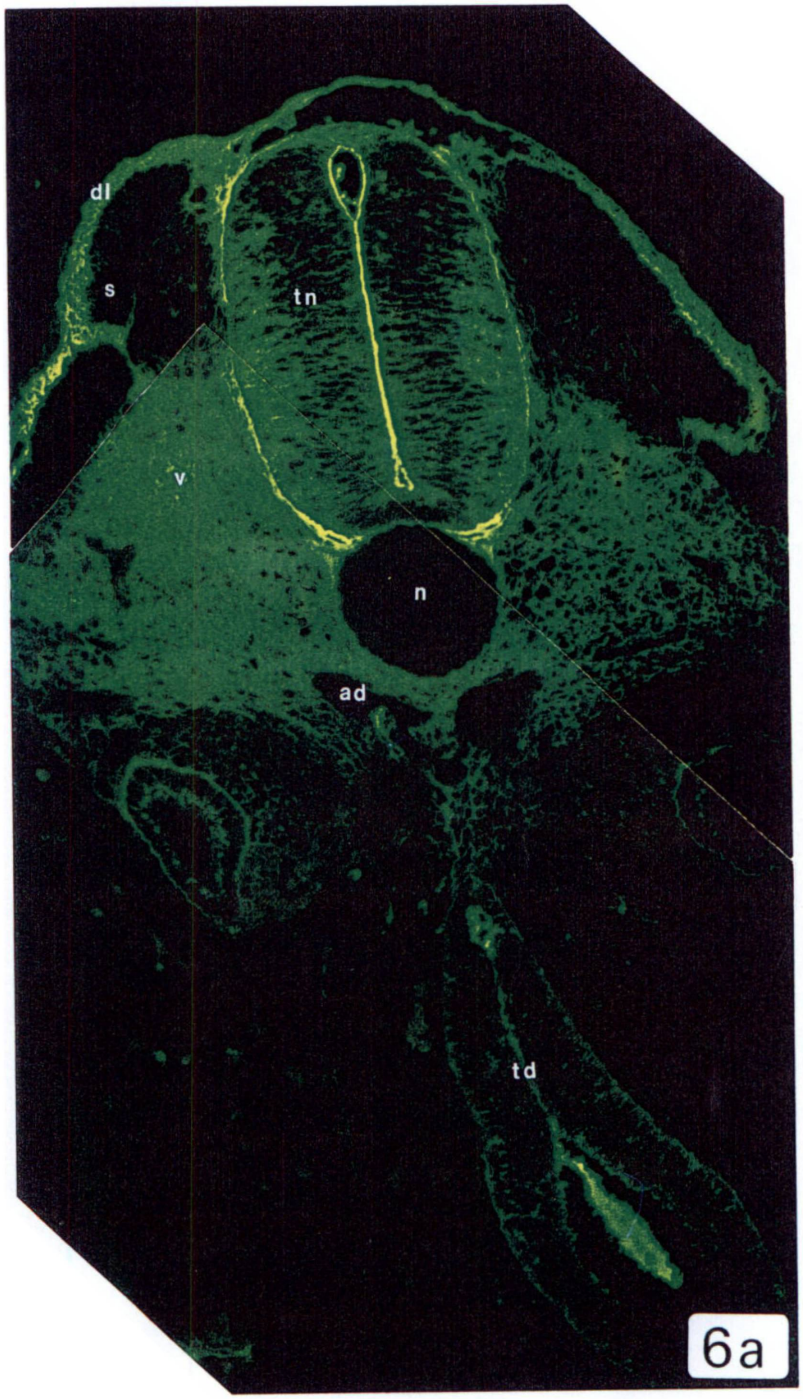


Fig. 6- Corte transversal de região sacral de embriões no estágio 20/21 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (200X). Observar via ventral uniformemente marcada. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; v= via ventral; n= notocorda; ad= aorta dorsal; td= tubo digestivo.

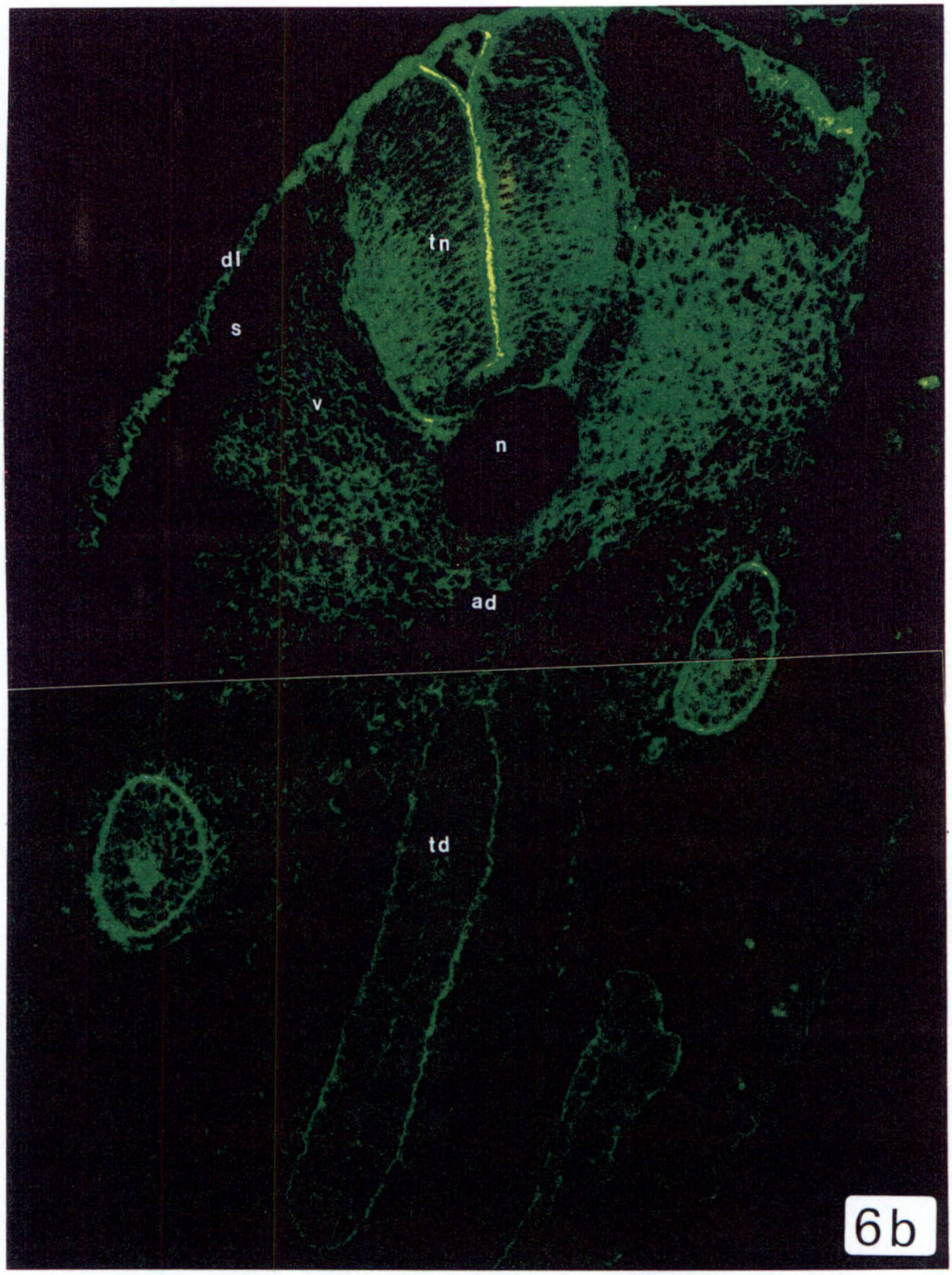


Fig. 6 (b) embrião de Sb com marcação pela PNA (200X). Observar via ventral apresentando gradiente de marcação. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; v= via ventral; n= notocorda; ad= aorta dorsal; td= tubo digestivo.

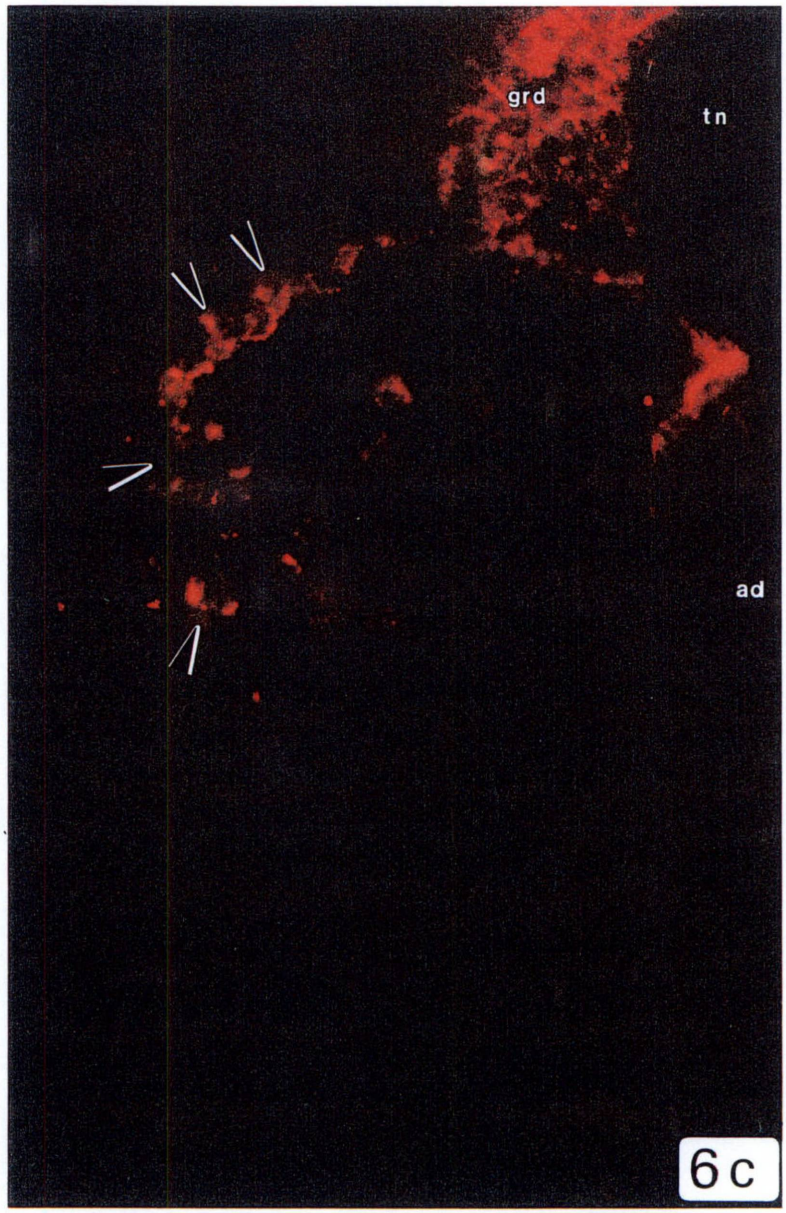


Fig. 6 (c) embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X). Observar células HNK-1 positivas ocupando a região correspondente à via ventral de migração. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; ad= aorta dorsal; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

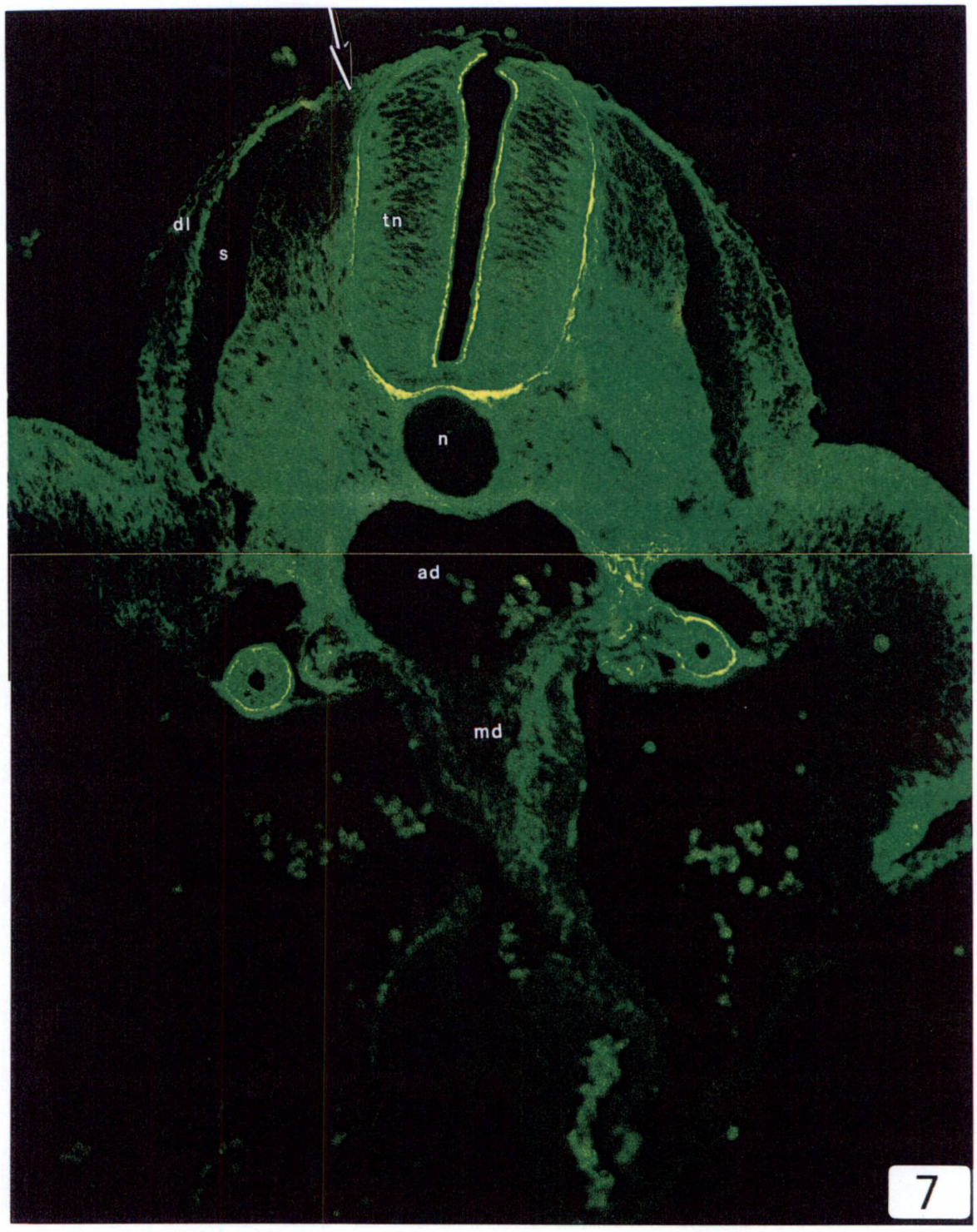


Fig. 7- Corte transversal de região do tronco de embrião de Sb no estágio 18 (HH) com marcação pela PNA (200X). Observar marcação positiva na via dorsolateral e via ventral com marcação mais intensa, e marcação positiva aos lados da aorta dorsal. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral, s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal; md= mesentério dorsal; seta= MSA.



Fig. 8- Corte transversal de região do tronco de embriões no estágio 20 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (200X). Observar início da via dorsolateral fracamente marcado. tn= tubo neural; dl= via dorsolateral; s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal; md= mesentério dorsal.

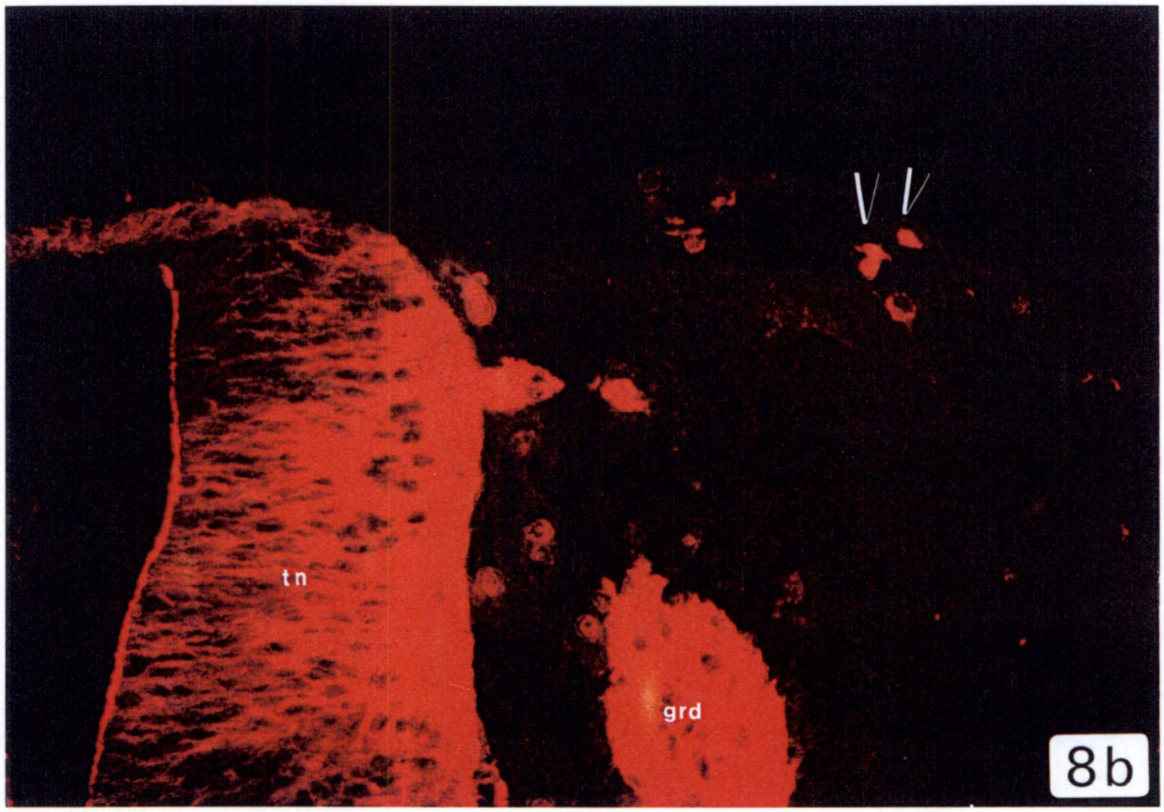


Fig. 8 (b) embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X). Observar células HNK-1 positivas ocupando a região correspondente à via dorsolateral de migração. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

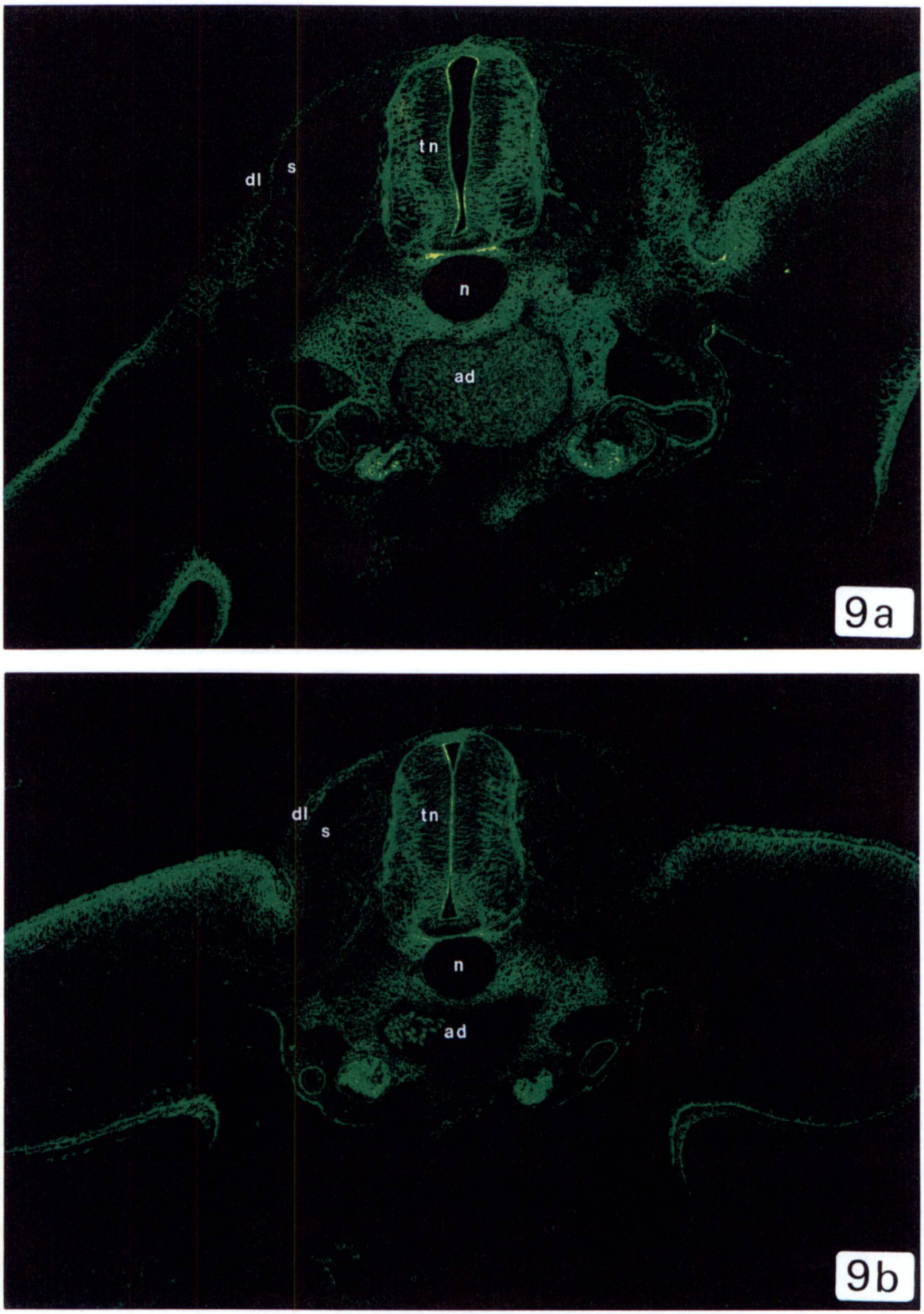
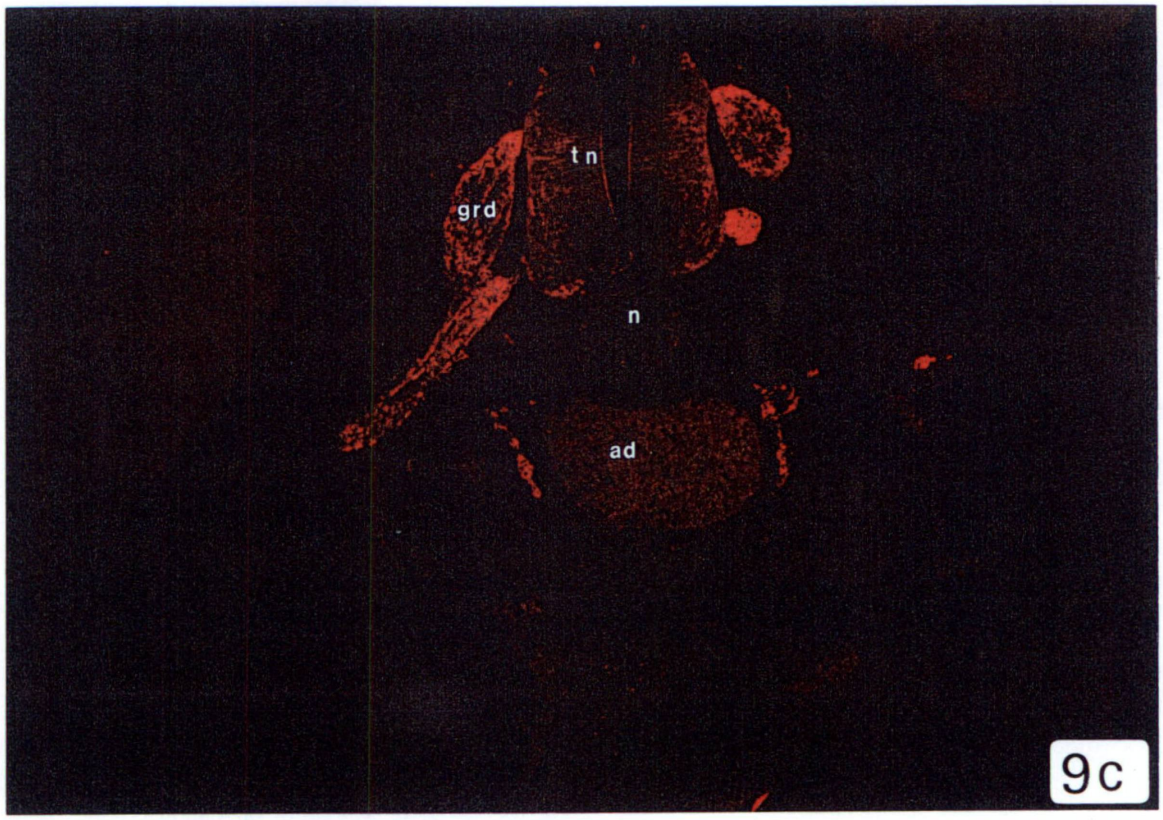


Fig. 9- Corte transversal de região do tronco de embriões no estágio 22 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X), **(b)** embrião de Sb com marcação pela PNA (100X). Observar via dorsolateral fracamente marcada e a região ventral de embrião de Lb com marcação mais intensa que a de embrião de Sb. tn= tubo neural; dl via dorsolateral; s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal.



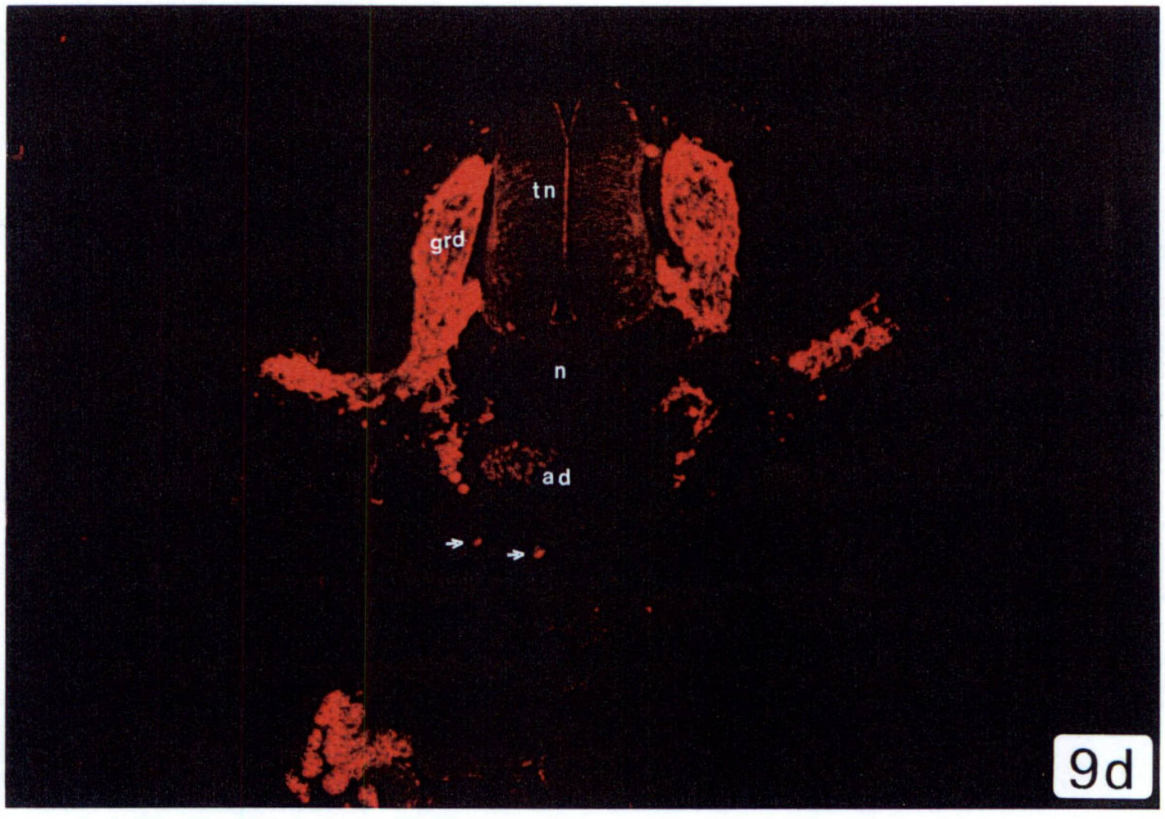


Fig. 9 (c) embrião de Lb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X) e **(d)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X). Observar células HNK-1 positivas localizadas ventralmente à aorta dorsal em embrião de Sb. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; n= notocorda; ad= aorta dorsal; setas= células HNK-1 positivas.

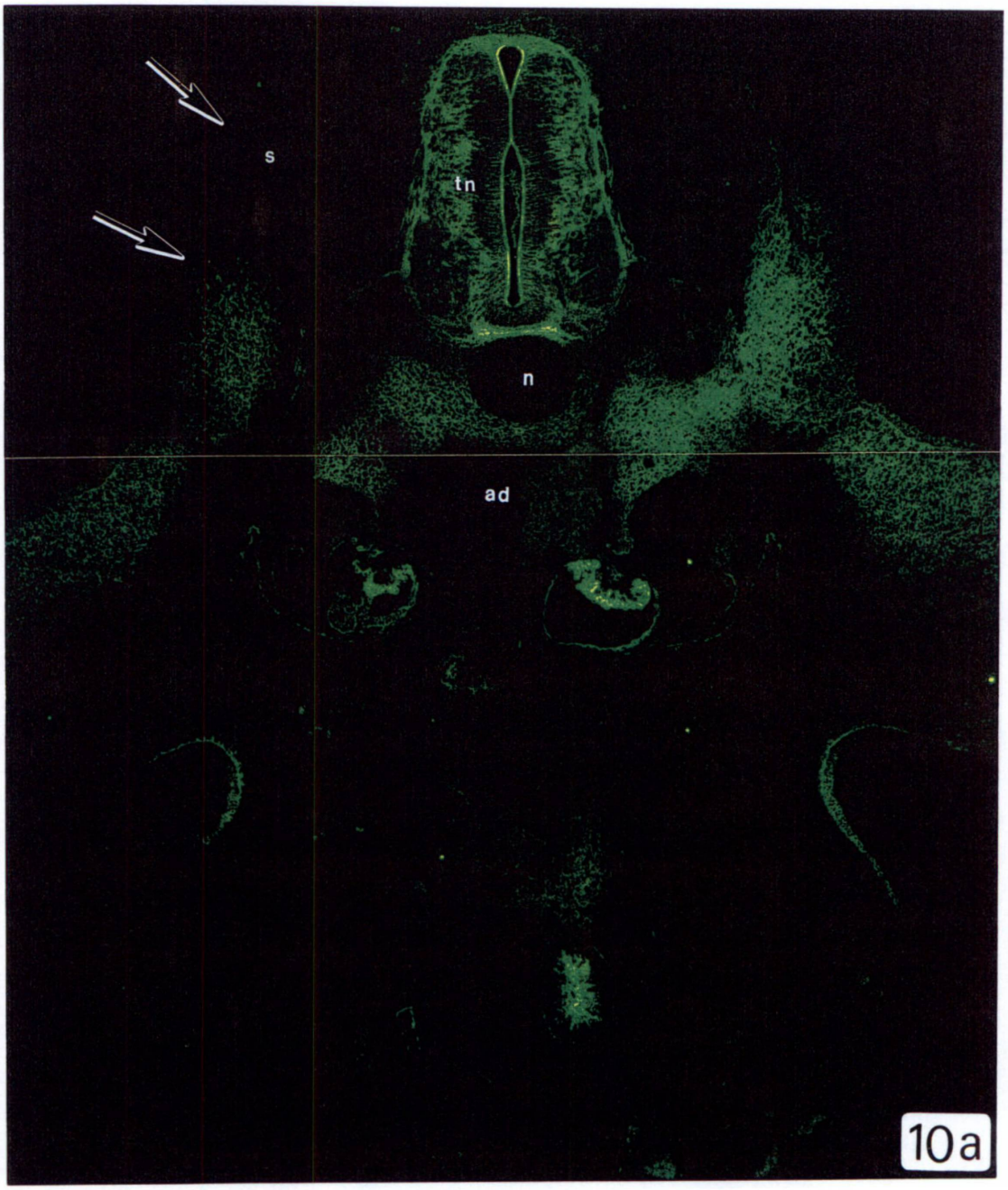


Fig. 10- Corte transversal de região do tronco de embriões no estágio 24 (HH) com marcação pela PNA. **(a)** embrião de Lb (100X). Observar via dorsolateral completamente livre de maração pela PNA. tn= tubo neural; s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal; setas= via dorsolateral.

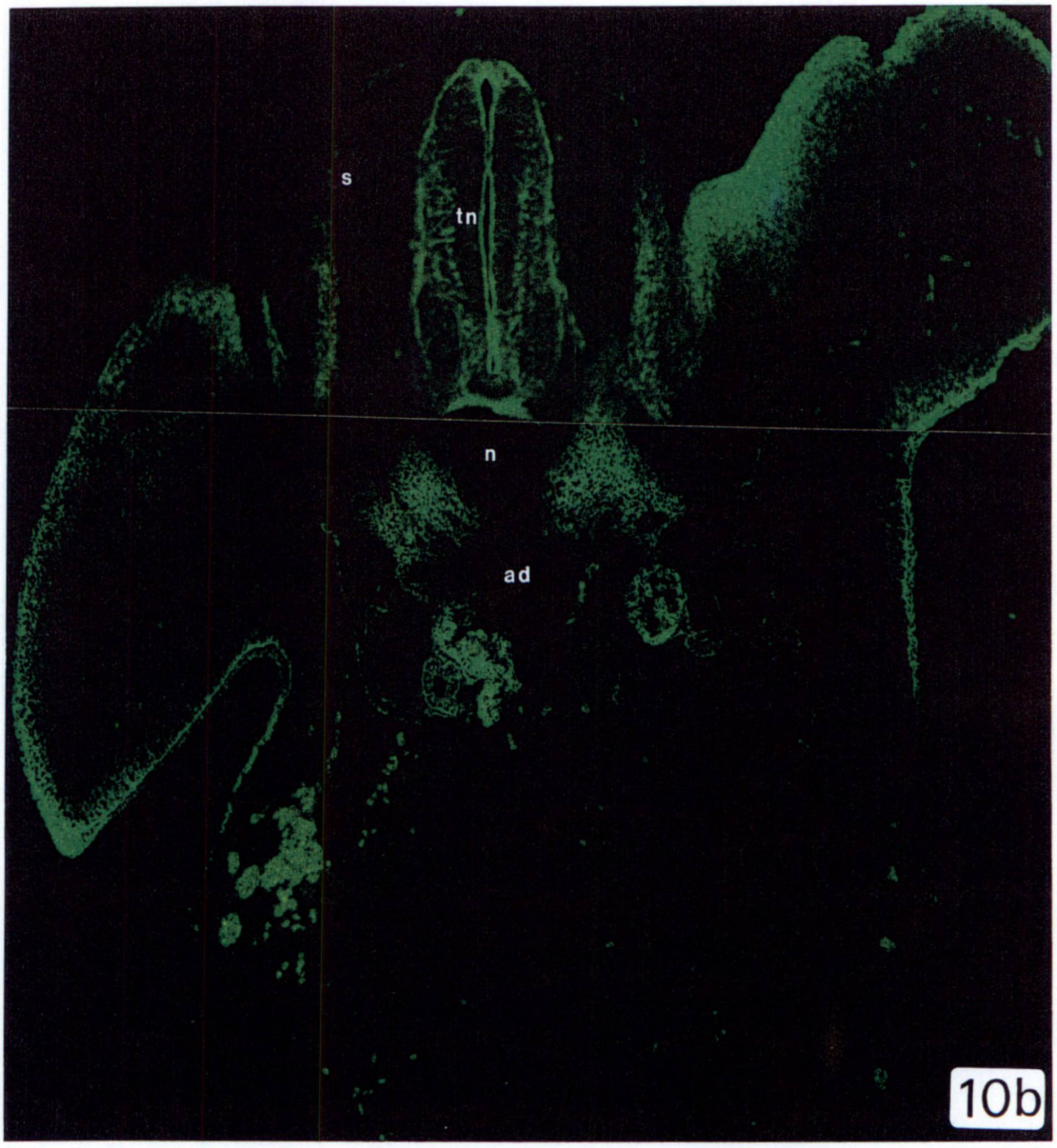


Fig. 10 (b) embrião de Sb (100X). Observar redução na marcação se comparada com a marcação de embriões do estágio anterior. tn= tubo neural; s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal.

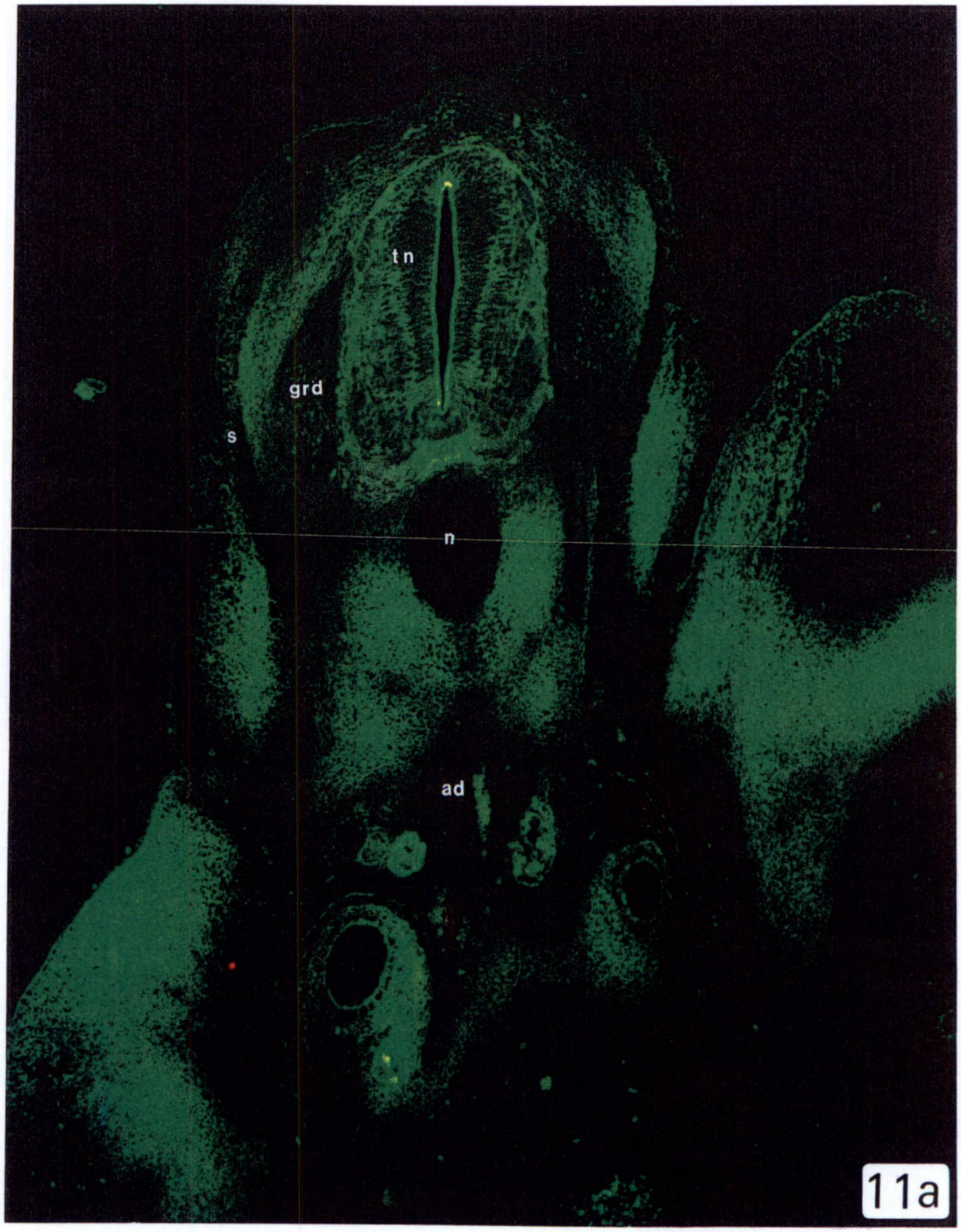


Fig. 11- Corte transversal de região do tronco de embriões no estágio 26 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X). Observar aumento na marcação por PNA se comparada com a marcação de embriões do estágio anterior. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; s= somito; n= notocorda; ad= aorta dorsal.

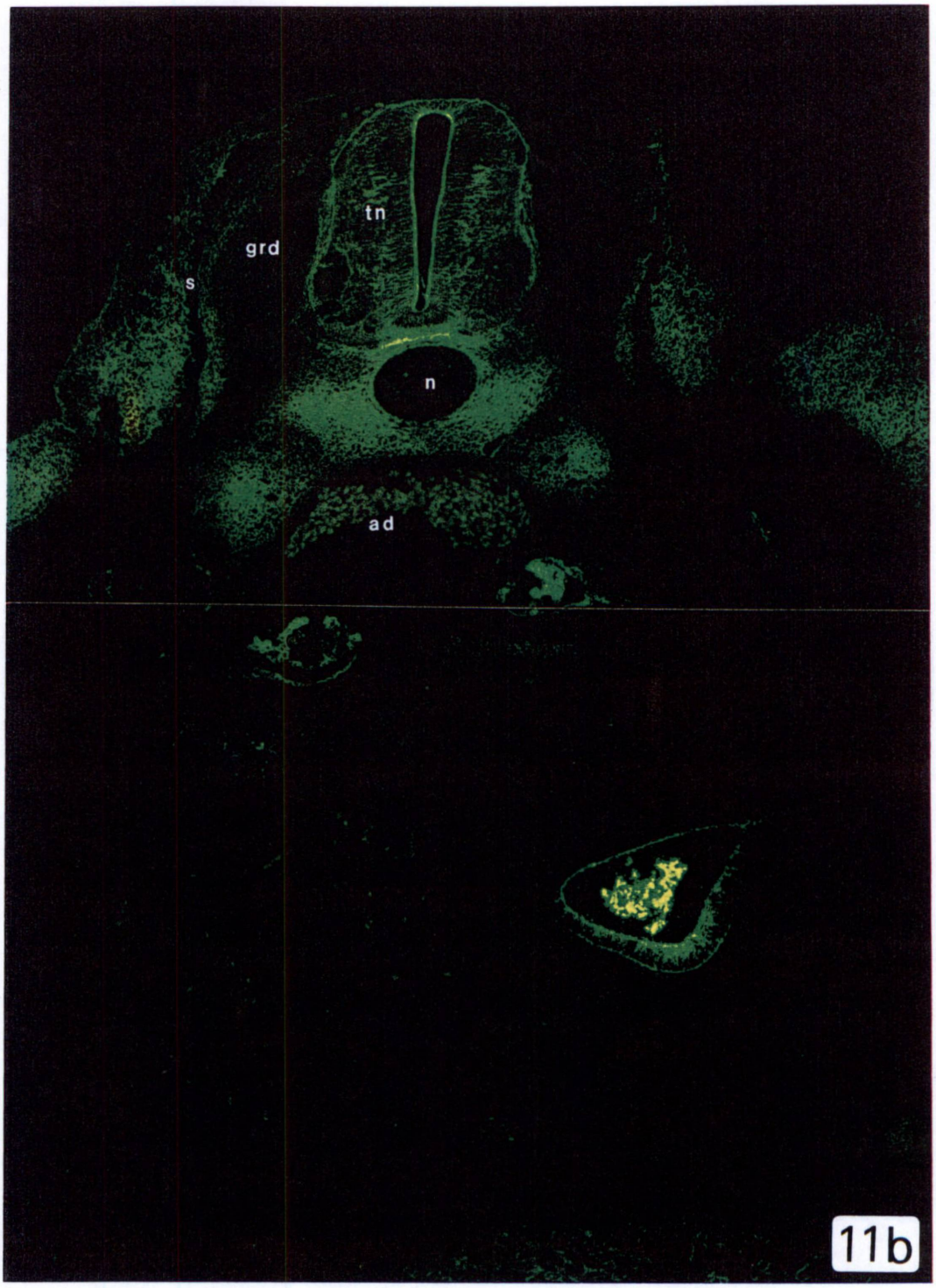


Fig. 11 (b) embrião de Sb com marcação pela PNA (100X). Observar região entre gânglio de raiz dorsal e somito apresentando apenas traços da marcação. tn= tubo neural; s= somito; grd= gânglio de raiz dorsal; n= notocorda; ad= aorta dorsal.



Fig. 11 (c) embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (100X). Observar células HNK-1 positivas migrando em direção ao nervo periférico. tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; n= notocorda; ad= aorta dorsal; np= nervo periférico; setas= células HNK-1 positivas.

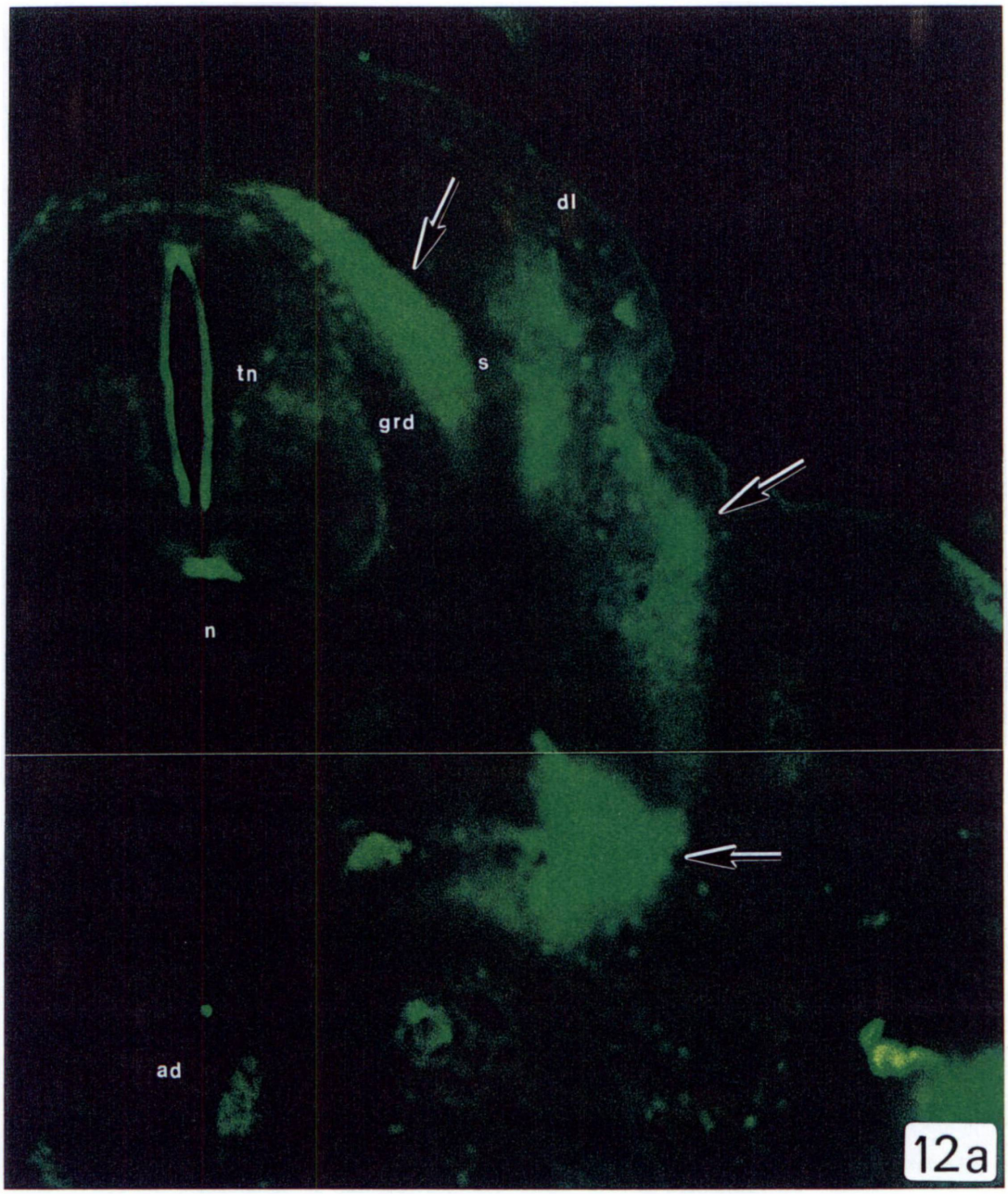


Fig. 12- Corte transversal de região do tronco de embriões no estágio 28 (HH). **(a)** embrião de Lb com marcação pela PNA (100X). Observar forte marcação na região entre gânglio de raiz dorsal e somito, na extremidade ventral do somito e na área que conecta a via dorsolateral à região ventral do embrião (setas). tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; s= somito; dl= via dorsolateral; n= notocorda; ad= aorta dorsal.

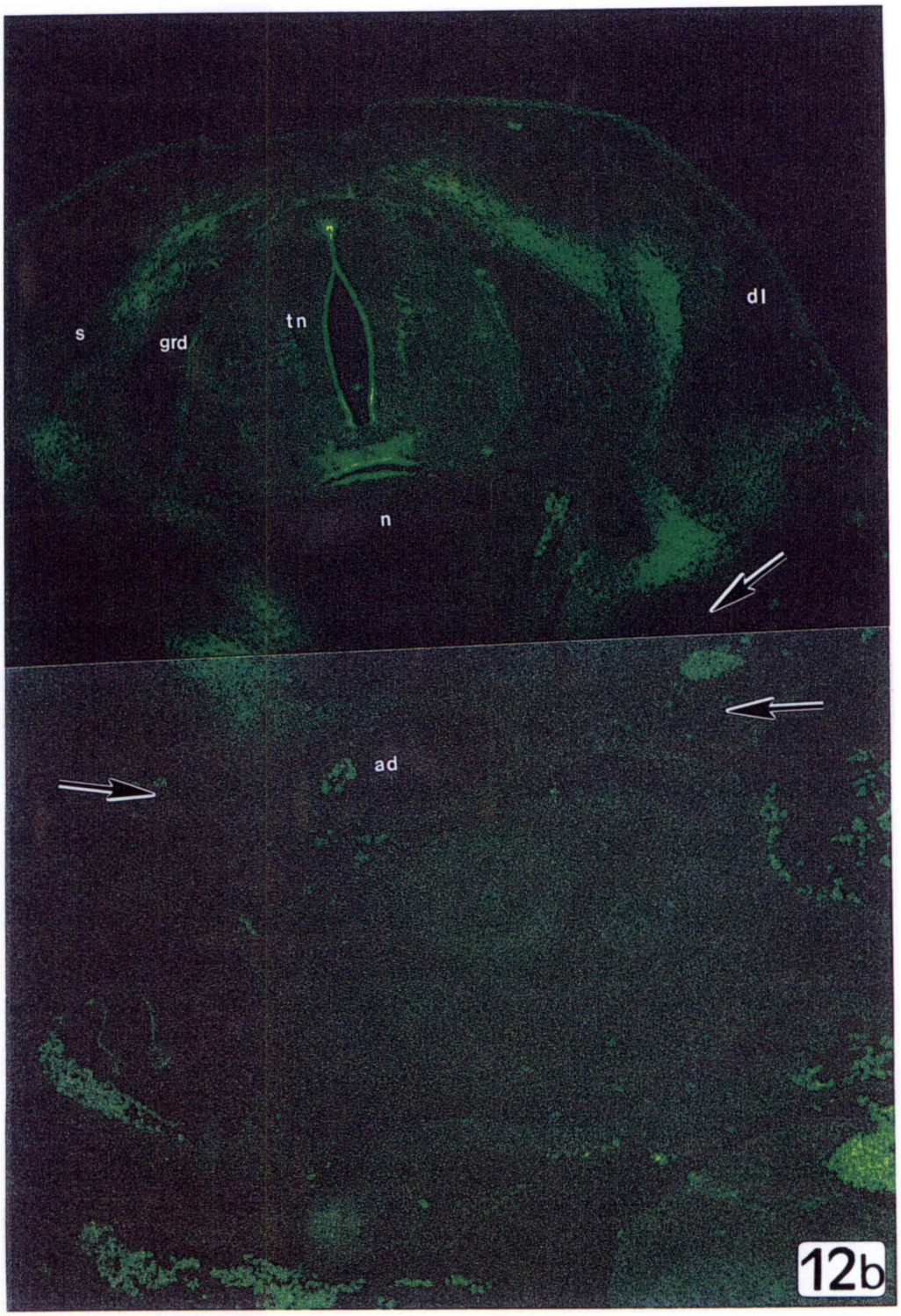
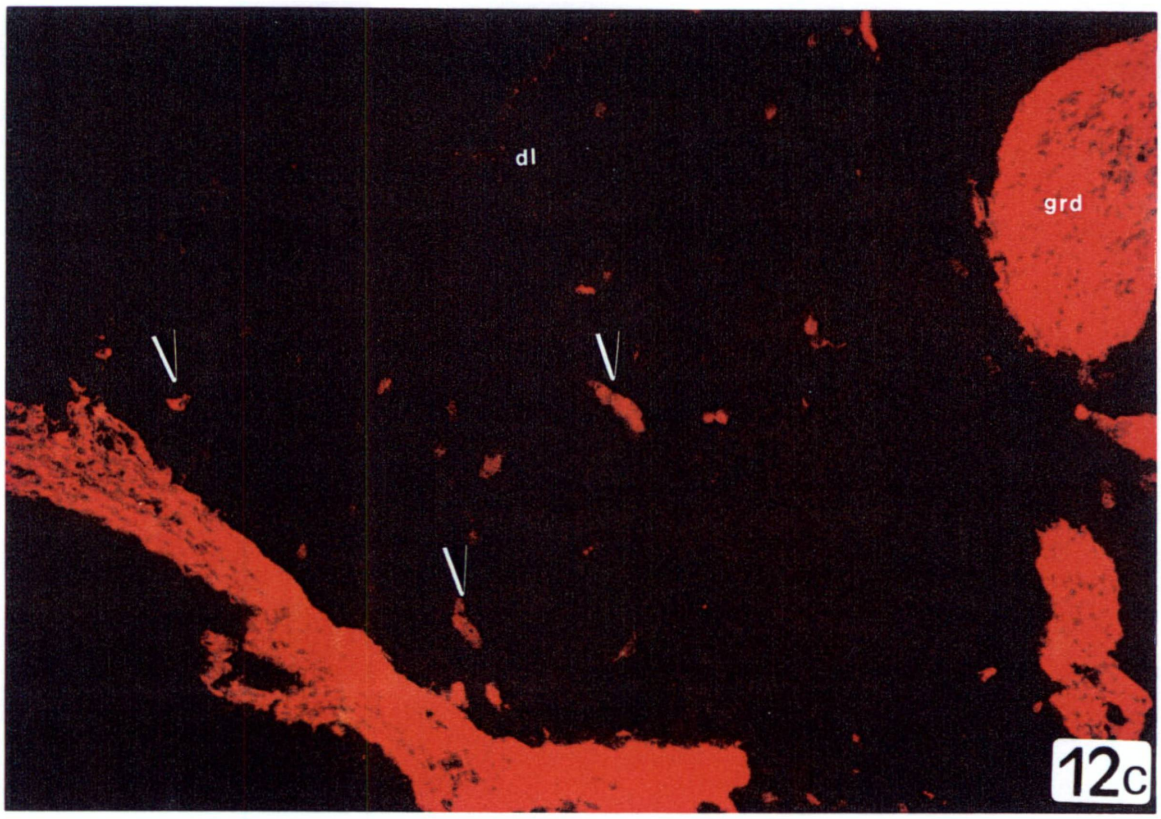


Fig. 12 (b) embrião de Sb com marcação pela PNA (100X). Observar espaço livre de marcação na área que conecta a via dorsolateral com a região ventral do embrião (setas). tn= tubo neural; grd= gânglio de raiz dorsal; s= somito; dl= via dorsolateral; n= notocorda; ad= aorta dorsal.



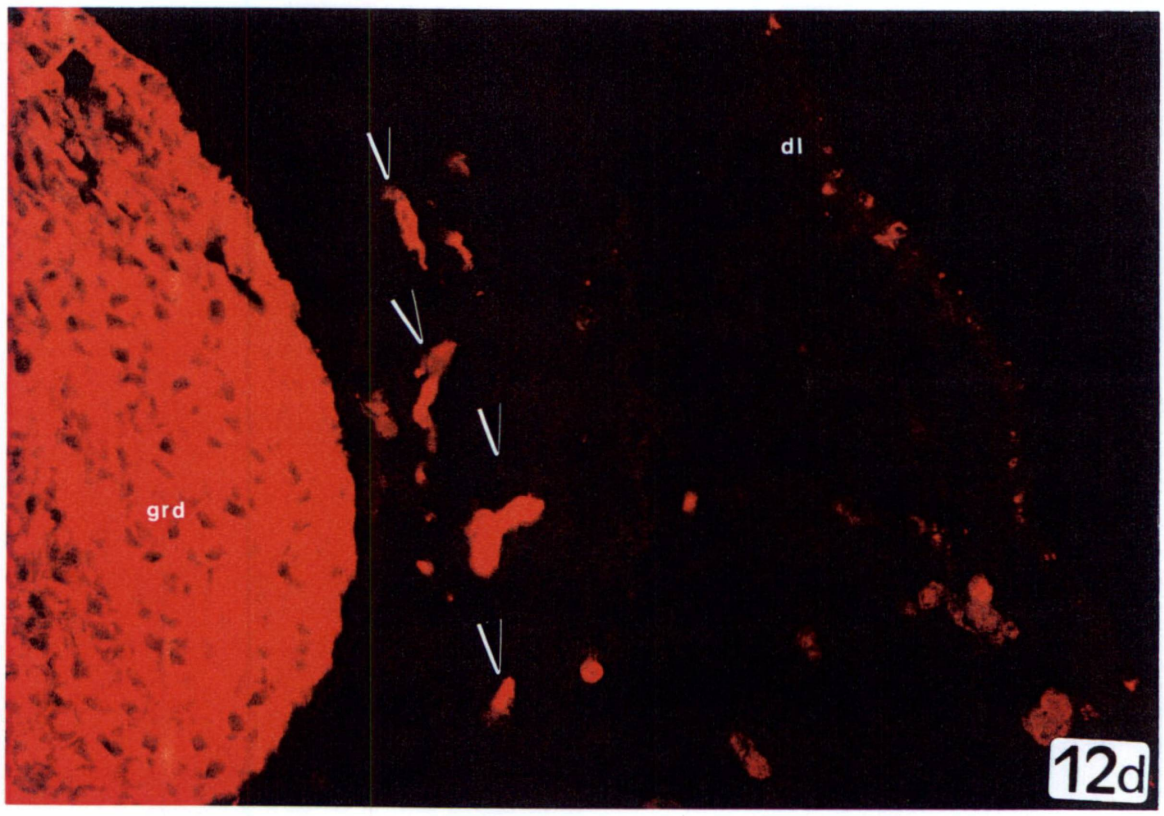


Fig. 12 (c) embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (200X) e **(d)** embrião de Sb com imunomarcação pelo HNK-1 (400X). Observar células HNK-1 positivas no trajeto entre as vias dorsolateral e ventral, parecendo células que se desviaram da via dorsolarteral. grd= gânglio de raiz dorsal; dl= via dorsolateral; cabeças de seta= células HNK-1 positivas.

6- DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

A migração das células da crista neural se inicia quando o tubo neural se fecha durante a neurulação, seguindo uma orientação ântero-posterior (BRONNER-FRASER, 1994). Essa migração é diferente em cada um dos níveis axiais. No nível vagal ocorrem três ondas migratórias diferentes. A primeira é dorsolateral, entre a ectoderme e o somito, e estas células invadem os arcos branquiais, não se diferenciando em melanócitos (CIMENT & WESTON, 1985). A segunda onda é ventral, entre tubo neural e somito, e estas células vão povoar o tubo digestivo e originar os gânglios entéricos (LE DOUARIN & TEILLET, 1973). A última onda migratória ao nível vagal é também dorsolateral; estas células vão povoar a derme e são especificadas como melanoblastos (REEDY *et al.*,1998b). Ao nível do tronco, ocorrem duas ondas migratórias, a primeira é ventral e esta população de células da crista neural vai originar os neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico e células adrenomedulares (BRONNER-FRASER, 1986; SERBEDZIJA *et al.*, 1989). A segunda onda é dorsolateral e estas células darão origem aos melanócitos (HULLEY *et al.*, 1991). Na região sacral também ocorrem duas ondas: ventral e dorsolateral, que originam os gânglios entéricos da porção pós-umbilical do tubo digestivo e os melanócitos respectivamente (LE DOUARIN & TEILLET, 1974).

Com base em observações de embriões de galinhas com padrão normal de pigmentação, ou seja que apresentam melanócitos somente ao nível da pele, Leghorn, e em embriões de Sedosa, a qual apresenta melanócitos em órgãos internos, além da pele (MAKITA & MOCHIZUKI, 1984; MAKITA & TSUZUKI, 1986; FARACO *et al.*,2001) buscou-se esclarecer melhor as influências da matriz extracelular na migração ventral para o povoamento do tubo digestivo, que só ocorre nos níveis vagal e sacral, e a questão da pigmentação interna apresentada pelas galinhas Sedosa Japonesa, investigou-se a distribuição espaço-temporal de glicoconjugados da matriz extracelular ligantes a PNA, os quais têm sido citados por estarem envolvidos com a inibição da migração das células da crista neural

(OAKLEY *et al.*, 1994). Analisou-se a distribuição das moléculas ligantes a PNA durante a migração ventral nos três níveis axiais (vagal, tronco e sacral), com o objetivo de observar qual o papel dessas moléculas na migração das células da crista neural para o tubo digestivo, já que células da crista neural vagal e sacral alcançam o tubo digestivo enquanto que células da crista neural do tronco não alcançam (LE DOUARIN & TEILLET, 1973; ERICKSON & GOINS, 2000). Análises também foram realizadas durante a migração dorsolateral na região do tronco ao nível do broto da asa, com o objetivo de observar qual o papel dessas moléculas na migração dorsolateral das células da crista neural (melanoblastos) e se existem diferenças nos padrões de distribuição dessas moléculas entre embriões de Leghorn e Sedosa.

Com os resultados obtidos observa-se que as células da crista neural que migram ventalmente, a linhagem neuronal, são capazes de se localizar em regiões onde existem moléculas ligantes a PNA em pequena concentração ou onde estão quase ausentes, sugerindo que essas moléculas, caso existam em altas concentrações, constituem uma barreira para esta linhagem de células da crista neural. A região ventral dos embriões está marcada pela PNA, mas apresentando um gradiente de marcação, que é muito forte ao redor da notocorda e decresce próximo a região do somito. Com a metodologia utilizada não pode-se afirmar que as células da crista neural observadas estavam se locomovendo, mas de qualquer forma, as células da crista neural se encontravam em regiões correspondentes ao caminho ventral. O mesentério dorsal, o qual funciona como portal de entrada das células da crista neural para o tubo digestivo aos níveis vagal e sacral, se apresenta livre da marcação pela PNA durante a migração ventral nestes níveis axiais (vagal e sacral). Ao nível do tronco o mesentério dorsal se apresentou livre da marcação pela PNA enquanto as células da crista neural da linhagem neuronal ainda estavam no trajeto em direção a ele, mas a certa distância. No momento em que as células poderiam adentrar por esse portal, uma barreira de moléculas ligantes a PNA se estabelece e se torna muito forte, podendo ser este um dos motivos pelos quais estas células não alcançam o tubo digestivo nesse nível axial, como observado por LE DOUARIN & TEILLET (1973) e confirmado por ERICKSON & GOINS (2000). ERICKSON & GOINS (2000) além disso, sugerem que ao nível sacral as células da

crista neural alcançam o mesentério dorsal e tubo digestivo devido a duas condições ambientais que favorecem essa migração. A primeira é que ao nível sacral as células da crista neural tomam um caminho mais ventral ao invés do caminho medial-lateral através dos somitos, chegando ao mesênquima do tubo digestivo muitas horas antes que ao nível torácico. Existe apenas uma estreita janela de oportunidade para a entrada no mesênquima do mesentério dorsal e tubo digestivo, assim, a chegada precoce garante às células da crista neural ter acesso ao tubo digestivo. A segunda condição citada pelas autoras é que ao nível sacral o endoderma do tubo digestivo é mais dorsalmente situado que ao nível do tronco, também facilitando a chegada precoce das células da crista neural ao nível sacral. A presença de glicoconjugados ao nível do tronco, no mesentério dorsal, somente em estágios em que as células estão chegando a estas regiões, mostra a natureza transitória de distribuição das moléculas durante o desenvolvimento.

Observou-se no presente trabalho que durante o período de migração ventral, o caminho dorsolateral sempre se apresenta muito marcado pela PNA. No momento em que a migração ventral está se encerrando, a marcação pela PNA na região correspondente à via ventral aumenta bastante, e as células da crista neural, agora, segundo ERICKSON & GOINS (2000) da linhagem melanocítica, começam a invadir a via dorsolateral. Neste momento, no início dessa migração, a marcação pela PNA vai desaparecendo à medida que a migração progride por essa via.

A região do somito posterior está sempre completamente marcada pela PNA, indicando mais uma vez que as moléculas ligantes a PNA funcionam como inibidoras da migração das células da crista neural, já que estas células migram somente através da metade anterior do somito (TOSNEY, 1991; ROBINSON *et al.*, 1997). Além de moléculas ligantes a PNA, existem outros fatores, como receptores de ephrinas e seus ligantes, envolvidos nesse padrão segmentado de migração das células da crista neural (KRULL *et al.*, 1997).

Não observou-se diferenças significativas no padrão de distribuição das moléculas ligantes a PNA durante a migração ventral entre embriões de Leghorn branca e Sedosa branca.

Observou-se que ocorre um decréscimo da marcação pela PNA na via dorsolateral enquanto a migração das células da crista neural avança por essa via

em embriões de ambas as raças, corroborando os resultados obtidos por OAKLEY e colaboradores (1994). Em embriões de Sedosa branca ocorre uma redução na marcação pela PNA na região ventral entre os estágios 22 e 24 (HH), iniciando a formação de uma faixa de pouca marcação pela PNA na via ventral que se encontra com a porção abaixo da extremidade mais ventral do somito, também com pouca marcação. Demonstrou-se pelo uso do anticorpo HNK-1, o qual possibilita a visualização de células da crista neural, a presença de células HNK-1 positivas na região ventral em embriões de Sedosa. Embora esse anticorpo não seja específico para melanoblastos, nesse momento as células da crista neural que estão em migração são especificadas como melanoblastos, como já observado por ERICKSON & GOINS (1995) e portanto pode-se inferir que as células observadas fora das regiões correspondentes à distribuição de células provenientes de migração ventral (gânglios, etc.) sejam melanoblastos. Não foi possível usar o anticorpo específico para melanoblastos pois o disponível (Smyth line) reconhece epítopo sensível a etanol e portanto seu uso seria incompatível com a metodologia utilizada.

Em embriões nos estágios 26 e 28 de Leghorn branca, observou-se bandas contínuas de marcação pela PNA desde a porção mais dorsal ao tubo neural entre o gânglio da raiz dorsal e o somito até a extremidade ventral do somito, acompanhando a raiz ventral e continuando pelo espaço perinotocordal, formando assim uma barreira molecular para as células da crista neural, que só migram pela via dorsolateral (melanoblastos) indo diretamente para o broto da asa, não tendo acesso à região ventral do embrião, e assim povoando somente áreas periféricas como demonstrado por REEDY e colaboradores (1998b). Já em embriões de Sedosa branca nos estágios 26 e 28 observou-se somente traços da marcação pela PNA entre o gânglio da raiz dorsal e o somito mesmo com áreas completamente livres de marcação, o que pode permitir que as células que deviam migrar nesse momento pela via dorsolateral, migrem por essa região correspondente à via ventral. Além disso, a região abaixo da extremidade ventral do somito se apresenta livre da marcação pela PNA, possibilitando que as células que estão migrando dorsolateralmente entrem por essa "janela" alcançando a região ventral do embrião, podendo ser essa uma das vias pela qual os melanoblastos ganham acesso a áreas

mais ventrais, o que pode explicar a pigmentação de órgãos internos em galinhas Sedosa. Observou-se também que não há marcação pela PNA no espaço entre a notocorda e a aorta dorsal em embriões de Sedosa branca e que existem células da crista neural ocupando essa região, concordando com FARACO e colaboradores (2001), os quais fizeram um mapeamento da migração dorsolateral das células da crista neural ao nível do tronco e observaram que em embriões de Sedosa, as células da crista neural alcançam regiões médio-ventrais como este espaço entre a notocorda e a aorta dorsal e o mesentério dorsal.

Em embriões de Leghorn as células da crista neural que migram dorsolateralmente, especificadas como melanoblastos, ao nível do tronco não alcançam regiões médio-ventrais, ficando restritas ao nível da pele. Já em embriões de Sedosa estas células migram dorsolateralmente, atingindo a pele, e além disso migram ventralmente e se desviam do caminho dorsolateral pela região abaixo da extremidade ventral do somito, as quais se encontram livres de marcação pela PNA. Os glicoconjugados de matriz extracelular ligantes a PNA estão desta forma envolvidos no diferente padrão de migração dorsolateral (de melanoblastos) observado em embriões de galinhas Sedosa. Obviamente estes glicoconjugados podem não ser as únicas moléculas envolvidas, fazendo-se necessária a investigação de outras moléculas, de matriz extracelular ou de membrana celular, que podem estar interagindo entre si, causando a inibição ou o estímulo da migração.

7- CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

Com base nos objetivos inicialmente propostos e nos resultados obtidos através da metodologia utilizada durante a realização desse trabalho, pode-se concluir que:

1. O caminho de migração ventral apresenta um gradiente de distribuição de glicoconjugados PNA-positivos, com o espaço perinotocordal fortemente marcado enquanto que próximo ao dermomiótomo a marcação é fraca;
2. Células da linhagem neuronal são capazes de migrar por regiões com pequena concentração de glicoconjugados PNA-positivos;
3. A presença de glicoconjugados PNA-positivos no mesentério dorsal ao nível do tronco é transitória, podendo sua presença constituir barreira no momento em que as células da crista neural alcançam acesso ao tubo digestivo ao nível do tronco;
4. Aos níveis vagal e sacral o mesentério dorsal se apresenta livre de glicoconjugados PNA-positivos no intervalo de tempo em que as células da crista neural da linhagem neuronal o alcançam;
5. A migração dorsolateral avança por essa via à medida que a presença de glicoconjugados PNA-positivos se reduz;
6. A presença constante de glicoconjugados PNA-positivos nas regiões ventrais de embriões de Lb, durante a migração dorsolateral ao nível do tronco, sugere o papel inibitório destas moléculas no povoamento ventral por melanócitos;
7. A fraca marcação e/ou falhas na marcação por PNA, em regiões ventrais ao nível do tronco, exibidas por embriões de Sb, sugere que a ausência de glicoconjugados permite que melanoblastos migrando dorsolateralmente ou pela via ventral invadam a região ventral do embrião.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS

BEUVAIS, A. *et al.* Changes in the fibronectin-specific integrin expression pattern modify the migratory behavior of sarcoma S180 cells in vitro and in embryonic environment. **J. Cell Biol.**, New York, v. 128, n. 4, p. 699-713, 1995

BRONNER-FRASER, M. Alterations in neural crest migration by a monoclonal antibody that affects cell adhesion. **J. Cell Biol.**, New York, v. 101, p. 610-617, 1985.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 115, p. 44-55, 1986.

BRONNER-FRASER, M. Neural crest cell formation and migration in developing embryo. **FASEB J.**, Bethesda, v. 8, p. 609-706, 1994.

BURNS, A. J.; CHAMPEVAL, D.; LE DOUARIN, N. M. Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut *in vivo* fail to compensate for lack of enteric ganglia. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 219, p. 30-43, 2000.

BURNS, A. J.; LE DOUARIN, N. M. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 4335-4347, 1998.

CIMENT, G.; WESTON, J. A. Segregation of developmental abilities in neural-crest-derived cells: identification of partially restricted intermediate cell types in the branchial arches of avian embryos. **Dev. Biol.**, Orlando, v.111, p. 73-83, 1985.

DELANNET, M. *et al.* Specific roles of the αVβ1, αVβ3 and αVβ5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 2687-2702, 1994.

DORSKY, R. I.; MOON, R. T.; RAIBLE, D. W. Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. **BioEssays**, New York, v. 22, p. 708-716, 2000.

DUBAND, J. L. *et al.* Neural crest cell locomotion induced by antibodies to β1 integrins: a tool for studying the roles of substratum molecular avidity and density in migration. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 98, p. 517-532, 1991.

DULAC, C.; LE DOUARIN, N. M. Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironmet. **Neurobiology**, Copenhagen, v. 88, p. 6358-6362, 1991.

EPPERLEIN, H. H.; HALFTER, W.; TUCKER, R. P. The distribution of fibronectin and tenascin along migratory pathways of the neural crest in the trunk of amphibian embryos. **Development**, Cambridge, v. 103, p. 743-756, 1998.

EPSTEIN, M. L. *et al.* Mapping the origin of the avian enteric nervous system with a retroviral marker. **Dev. Dyn.**, New York, v. 201, p. 236-244, 1994.

ERICKSON, C. A. Control of pathfinding by the avian trunk neural crest. **Development**, Cambridge, v. 103, p. 63-80, 1988. Supplement.

ERICKSON, C. A. Morphogenesis of the avian trunk neural crest: use of morphological techiniques in elucidating the process. **Mic. Res. Tech.**, New York, v. 26, p. 329-351, 1993.

ERICKSON, C. A.; DUONG, T. D.; TOSNEY, K. W. Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 151, p. 251-272, 1992.

ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Avian neural crest can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development**, Cambridge, 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.**, Orlando, v. 219, p. 79-97, 2000.

ERICKSON, C. A.; PERRIS, R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 156, p. 60-74, 1993.

ERICKSON, C. A.; REEDY, M. V. Neural crest development: The interplay between morphogenesis and cell differentiation. **Curr. Top. Dev. Biol.**, San Diego, v. 40, p. 177-209, 1998.

ERICKSON, C. A.; TOSNEY, K. W.; WESTON, J. A. Analysis of migratory behavior of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 77, p. 142-156, 1980.

ERICKSON, C. A.; TURLEY, E. A. Substrata formed by combinations of extracellular matrix components alter neural crest cell motility *in vitro*. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 61, p. 299-323, 1983.

FAIRMAN, C. L. *et al.* Appearence of neurons in the developing chick gut. **Dev. Dyn.**, New York, v. 204, p. 192-201, 1995.

FARACO, C. D. *et al.* 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, n. 3, p. 212-225, 2001.

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **J. Neurobiol.**, New York, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1993.

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

HEARN, C.; NEWGREEN, D. Lumbo-sacral neural crest contributes to the avian enteric nervous system independently of vagal neural crest. **Dev. Dyn.**, New York, v. 218, p. 525-530, 2000. Brief Communication.

HULLEY, P. A.; STANDER, C. S.; KIDSON, S. H. Terminal migration and early differentiation of melanocytes in embrionic chick skin. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 145, p. 182-194, 1991.

JIN, E. J. *et al.* Wnt and BMP sinaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 233, p. 22-37, 2001.

KERR, R. S. E.; NEWGREEN, D. F. Isolation and characterization of chondroitin sulfate proteoglycans from embryonic quail that influence neural crest cell behavior. **Dev. Biol.**, Orlando, v.192, p. 108-124, 1997.

KOS, R. *et al.* The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. **Development**, Cambridge, v. 128, p. 1467-1479, 2001.

KROTOSKI, D. M.; DOMINGO, C.; BRONNER-FRASER, M. Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in the avian embryo. **J. Cell Biol.**, New York, v. 103, p. 1061-1071, 1986.

KRULL, C. E. *et al.* Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 3733-3743, 1995.

LALLIER, T.; BRONNER-FRASER, M. Avian neural crest cell attachment to laminin: involvement of divalent cation dependent and independent integrins. **Development**, Cambridge, v. 113, p. 1069-1084, 1991.

LALLIER, T.; BRONNER-FRASER, M. $\alpha 1\beta 1$ integrin on neural crest cells recognizes some laminin substrata in a Ca^{2+}-independent manner. **J. Cell Biol.**, New York, v. 119, n. 5, p. 1335-1345, 1992.

LALLIER, T.; BRONNER-FRASER, M. Inhibition of neural crest cell attachment by integrin antisense oligonucleotides. **Science**, Washington, v. 259, p. 692-695, 1993.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. The neural crest. 2nd ed.Cambridge: **Cambridge Univ. Press**, 1999.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 30, n. 1, p. 31-48, 1973.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. 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.**, Orlando, v. 41, p. 162-184, 1974.

LORING, J. F.; ERICKSON, C. A. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 121, p. 220-236, 1987.

MACKIE, E. J. *et al.* The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. **Development**, Cambridge, v. 102, p. 237-250, 1988.

MAKITA, T.; MOCHIZUKI, S. Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl. **The Yamaguchi J. of Vet. Med.**, Yamaguchi, v. 11, p. 17-38, 1984.

MAKITA, T.; TSUZUKI, Y. Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl. **The Yamaguchi J. of Vet. Med.**, Yamaguchi, v. 13, p. 11-20, 1986.

MONIER-GAVELLE, F.; DUBAND, J. L.Cross talk between adhesion molecules: Control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by β1 and β3 integrins in migrating neural crest cells. **J. Cell Biol.**, New York, v. 137, n. 7, p. 1663-1681, 1997.

NAKAGAWA, S.; TAKEICHI, M. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 1321-1332, 1995.

NEWGREEN, D. F.; SCHEEL, M.; KASTNER, V. Morphogenesis of sclerotome and neural crest in avian embryos: *in vivo* and *in vitro* studies on the role of notochordal extracellular material. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 224, p. 299-313, 1986.

OAKLEY, R. A. *et al.* Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 103-114, 1994.

PERISSINOTTO, D. *et al.* Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 2823-2842, 2000.

PETERS-VAN DER SANDEN, M. J. H. *et al.* Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. **Dev. Dyn.**, New York, v. 196, p. 183-194, 1993.

PETTWAY, Z. *et al.* Age-dependent inhibition of neural crest migration by the notochord correlates with alterations in the S103L chondroitin sulfate proteoglycan. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 225, p. 195-206, 1996.

POMERANZ, H. D.; GERSHON, M. D. Colonization of the avian hindgut by cells derived from the sacral neural crest. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 137, p. 378-394, 1990.

POMERANZ, H. D. *et al.* Neural crest-derived cells isolated from the gut by immunoselection develop neuronal and glial phenotypes when cultured on laminin. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 156, p. 341-361, 1993.

POMERANZ, H. D.; ROTHMAN, T. P.; GERSHON, M. D. Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using na intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. **Development**, Cambridge, v. 111, p. 647-655, 1991(a).

POMERANZ, H. D. *et al.* Expression of a neurally related laminin binding protein by neural crest-derived cells that colonize the gut: relationship to the formation of enteric ganglia. *The Journal of* **Comp. Neurol.**, New York, v. 313, p. 625-642, 1991(b).

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

REEDY, M. V.; FARACO, C. D.; ERICKSON, C. A. Specification and migration of melanoblasts at the vagal level and in hyperpigmented Silkie chickens. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 213, p. 476-485, 1998(b).

ROBINSON, V. *et al.* Roles of Eph receptors and ephrins in neural crest pathfinding. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 290, p. 265-274, 1997.

ROTHMAN, T. P. *et al.* Developmental potencial neural crest-derived cells migrating from segments of developing quail bowel back-grafted into younger chick host embryos. **Development**, Cambridge, v. 109, p. 411-423, 1990.

ROTHMAN, T. P. *et al.* Colonization of the bowel by neural crest-derived cells re-migrating from foregut backtransplantated to vagal or sacral regions of host embryos. **Dev. Dyn.**, New York, v. 196, p. 217-233, 1993.

RUNYAN, R. B.; MAXWEEL, G. D.; SHUR, B. D. Evidence for a novel enzymatic mechanism of neural crest cell migration on extracellular glycoconjugate matrices. **J. Cell Biol.**, New York, v. 102, p. 432-441, 1986.

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

SHUR, B. D. Cell surface glycosyltransferase activities during normal and mutant (T/T) mesenchyme migration. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 91, p. 149-162, 1982.

TOSNEY, K. W. Cells and cell-interactions that guide motor axons in the developing chick embryo. **BioEssays**, New York, v. 13, p. 17-23, 1991.

TOSNEY, K. W.; DEHNBOSTEL, D. B.; ERICKSON, C. A. Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 163, p. 389-406, 1994.

TUCKER, G. C.; CIMENT, G.; THIERY, J. P. Pathways of avian neural crest cell migration in the developing gut. **Dev. Biol.**, Orlando, v. 116, p. 439-450, 1986.