



Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes


Patrícia Alzueta Moreno Martinez

Estudo fenotípico da região Aorta-Gônada-Mesonefros, de embriões de galinhas *Gallus gallus domesticus*, com ênfase na aorta dorsal.

Rio de Janeiro
2012

Patrícia Alzueta Moreno Martinez

Estudo fenotípico da região Aorta-Gônada-Mesonefros, de embriões de galinhas *Gallus gallus domesticus*, com ênfase na aorta dorsal



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Coorientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M385 Martinez, Patrícia Alzueta Moreno.
Estudo fenotípico da região Aorta-Gônada-Mesonefros, de embriões de galinhas *Gallus gallus domesticus*, com ênfase na aorta dorsal / Patrícia Alzueta Moreno Martinez. – 2012.
78 f.

Orientador: Marcelo Pelajo Machado.
Coorientador: Jorge José de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Aorta – Teses. 2. Aorta – Embriologia. 3. Hematopoese – Teses. 4. Galinha – Embrião – Teses. 5. Fenotipo – Teses. 6. Endotélio vascular – Teses. I. Machado, Marcelo Pelajo. II. Carvalho, Jorge José de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.132

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Patrícia Alzueta Moreno Martinez

Estudo fenotípico da região Aorta-Gônada-Mesonefros, de embriões de galinhas *Gallus gallus domesticus*, com ênfase na aorta dorsal

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de outubro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. João Carlos Cortes Júnior
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Ao Daniel, Mabel e Paula, três pessoas que amo incondicionalmente. Ao Dr. Henrique Leonel Lenzi (in memoriam), pelo exemplo de grande alma e grande cientista, que tive o privilégio de conhecer e conviver. Aos "amigos-irmãos" por sua amizade, carinho e torcida.

Aos que, como eu, se encantam com a beleza e complexidade da vida ao trabalhar com um microscópio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o Dr. Marcelo Pelajo Machado, por todo o trabalho no desenvolvimento desta dissertação e por ser um orientador tão presente. Você me ensinou Microscopia, que no início eu não gostava porque parecia muito difícil, com muita física, mas que ao longo dos anos tornou-se algo divertido. Agradeço pelo convívio agradável, com muitas gargalhadas e pela amizade. Você é um grande exemplo como cientista, muito capaz e dedicado.

Muito obrigada à equipe do Laboratório de Patologia da Fiocruz, que me auxiliou na execução deste trabalho. O corpo técnico é excelente e este trabalho não sairia sem o trabalho de vocês. Aos funcionários, doutores, técnicos, estudantes, pessoas com quem convivi por anos: muito obrigada.

Ao Prof. Jorge Carvalho pelo auxílio na execução deste trabalho e por aceitar ser meu co-orientador.

Ao Prof. Carlos Mandarin, por ter me estimulado a fazer a pós-graduação.

À minha família, pelo apoio e compreensão nesta fase que praticamente me viram sentada na frente do computador ou voltando tarde do laboratório.

Aos amigos, que em muitos momentos me deixaram feliz com o seu constante apoio e frases de estímulo.

Eu só quero
ver a vida na forma como vê uma criança
o mundo, cheio de possibilidades e beleza,
as pessoas, boas, más, amigáveis, complexas, divinas.
Não quero decidir a minha vida toda de uma vez
quero só decidir o próximo passo.
Quero errar, tentar de novo, me reinventar,
traçar novos planos.
Não peço a Deus cargas mais leves
peço apenas força e garra para lidar com as vicissitudes da vida.
E quem entende o mistério da vida?
Deixar e reencontrar as mesmas pessoas a cada momento,
Cada uma, somando algo às nossas vidas
ou refletindo em si mesmas um defeito nosso.
Que eu nunca, jamais, perca o entusiasmo pela vida e pelas pessoas.
Que eu cumpra o meu papel aqui, seja ele qual for
até a minha última respiração - com coragem, humildade e alegria.

Patrícia Martinez

RESUMO

MARTINEZ, Patrícia Alzueta Moreno. *Estudo fenotípico da região da Aorta-Gônada-Mesonefros, de embriões de galinhas Gallus galus domesticus, com ênfase na aorta dorsal*. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Acredita-se que os primeiros progenitores da hematopoese definitiva surjam da diferenciação do endotélio da aorta dorsal, na altura da região da Aorta-Gônada-Mesonefros (AGM). Com o intuito de estudar esta região e o fenótipo das células do endotélio da aorta dorsal nesta posição topográfica, ovos galados de *Gallus gallus domesticus* L. foram incubados em chocadeira, classificados em estádios de E16 a E25 e processados histotecnologicamente para obtenção de secções seriadas na altura da região AGM. Estas passaram por coloração por Hematoxilina-Eosina, histoquímica para PAS, PAS-díastase e Alcian Blue pH 1.0 e pH 2.5, histoquímica por lectinas fluoresceinadas e imunofluorescência para moléculas de superfície, citoesqueleto e matriz extracelular. Foi observada hipertrofia endotelial no assoalho da aorta nos estádios observados, o qual se apresentava positivo ao PAS, com ocorrência frequente de vacuolizações basais PAS negativas, e o surgimento ocasional de agrupamentos celulares intravasculares. Nestes, as células que se destacavam da membrana basal do endotélio expressavam progressivamente mais material PAS positivo, o qual, no entanto, em nenhum momento pareceu se tratar de glicogênio. Em relação às glicosaminoglicanas, notamos a presença predominante de ácido hialurônico por todo o mesênquima da região e em outras estruturas como periferia da notocorda, tubo neural e mesoderma lateral. Ocorreu co-expressão de fibronectina e α -actina de músculo liso em células circunjacentes à aorta, na face ventral do vaso. GFAP e BMP-4 são expressas entre as células do tubo neural e em sua periferia, assim como na notocorda do embrião. As lectinas *Abrus precatorius*, *Lens culinaris* e *Ricinus communis* mostraram-se positivas principalmente na região subendotelial do assoalho da aorta nos estádios observados neste trabalho. *Bandeiraea simplicifolia* exibiu pouca marcação na aorta dorsal e a *Arachis hypogaeae* foi negativa. Outras estruturas da região AGM também expressaram resíduos de açúcares revelados por estas lectinas, tais como: notocorda, tubo neural, mesênquima, intestino primitivo e saco vitelínico. Estes resultados acrescentam elementos morfológicos e bioquímicos ao conhecimento sobre a região AGM de embriões de galinha e sobre o endotélio, possivelmente hemogênico, da aorta dorsal.

Palavras-chave: Precusores hematopoiéticos. Região AGM. Embrião de galinha. Aorta dorsal. Fenótipo do endotélio. Perfil bioquímico.

ABSTRACT

Nowadays it is known that firsts definitive hematopoietic progenitors arise from endothelium differentiation of dorsal aorta, at Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) site. In order to study those events and cells phenotype of dorsal aorta endothelium in this topographical site, fertilized eggs of *Gallus gallus domesticus* L. were incubated, from E16 to E25 and to be processed by histotechnology to obtain serial sections of the AGM site. After this, they were stained with Hematoxylin-Eosin, histochemistry to PAS, diastase PAS and Alcian Blue pH 1.0 and pH 2.5, to obtain a better overview and characterization from cells, also, histochemistry to fluorescein lectins and immunofluorescence to surface molecules, cytoskeleton and extracellular matrix were performed. Our results showed endothelial hypertrophy of the aorta floor in the stages analyzed, which shown positive for PAS, with frequent appearance of PAS negatives basal vacuolizations and an occasional intravascular cell clusters arise of. It was also observed that cells which were separated from endothelium basal membrane shown progressively were more PAS positive which however in any time seems to be glycogen. Regard of glycosaminoglycans we noted the main presence of hialuronic acid for all the mesenchyme's site and in others structures like notochord periphery, neural tube and lateral mesoderm. It was observed fibronectin and smooth muscle α -actin co-expression on aorta surrounding walls, at vessel's ventral face. GFAP and BMP-4 are express between the cells of neural tube and surrounding it, as well as at embryo notochord. The lectins *Abrus precatorius*, *Lens culinaris* and *Ricinus communis* showed mostly positive expression on the sub endothelium site of the dorsal aorta floor at the stages analyzed in this work. *Bandeiraea simplicifolia* showed low expression on dorsal aorta and in *Arachis hypogaeae* it was negative. Other structures of AGM's site also expressed sugar residues revealed by these lectins like: notochord, neural tube, mesenchyme, primitive gut and yolk sac.

Keywords: Hematopoietic progenitors. AGM site. Chicken embryo. Dorsal aorta. Endothelium phenotype. Biochemical profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – substâncias estimuladoras e diferenciação das células-tronco hematopoéticas.....	19
Figura 2 – populações celulares na aorta dorsal em embriões de galinha e de rato.....	21
Figura 3 – os dois tecidos embrionários que formam a aorta dorsal.....	22
Figura 4 – principais classes de glicanas animais.....	26
Figura 5 – corte transversal de embrião E16-17, na altura da região AGM, HE, 10X/0.25NA.....	34
Figura 6 – setas apontam detalhe de hipertrofia no endotélio do assoalho da aorta dorsal, contendo vacuolizações - embrião E16-17, 40X/1.3NA, HE.....	34
Figura 7 – setas apontam detalhe de hipertrofia de um dos lados da aorta dorsal em embrião E16-17, HE, 40X/1.3NA.....	34
Figura 8 – seta aponta detalhe de um dos lados de pouca hipertrofia em embrião E16-17 HE.....	34
Figura 9 – notocorda (N) e aorta dorsal (AD) de embrião E17. HE, 20X/0.45NA.....	35
Figura 10 – setas apontam detalhe do assoalho hipertrófico da aorta dorsal de embrião E19. E, 40X/1.3NA.....	35
Figura 11 – detalhe da aorta dorsal em embrião E20. HE, 40X/ 1.3NA.....	35
Figura 12 – setas apontam detalhe do endotélio da aorta dorsal menos hipertrófico, em embrião E21. HE, 40X/1.3NA.....	35
Figura 13 – secção transversal de embrião E16-17, na altura da região AGM. PAS, 10X/0.25NA.....	38
Figura 14 – detalhe do endotélio da aorta dorsal em embrião E16-17. Observam-se através das setas as inclusões endoteliais negativas. PAS, 40X/1.3NA..	38
Figura 15 – detalhe das inclusões endoteliais negativas mostradas pelas setas de cor preta no endotélio de embrião E16-17. PAS, 40X/1.3NA.....	38
Figura 16 – detalhe do endotélio do assoalho da aorta dorsal, em embrião E16-17. Seta de cor preta mostra mitose observada em alguns pontos do endotélio. Setas na cor azul mostram vacuolizações observadas no endotélio. PAS, 40X/1.3NA.....	39

Figura 17 – detalhe das inclusões negativas em PAS e células em mitose do endotélio da aorta. 40X/1.3NA.....	39
Figura 18 – detalhe do endotélio com hipertrofia em embrião E17. Observar a membrana basal bem delimitada (setas) pelo PAS. PAS, 40X/1.3NA....	39
Figura 19 – detalhe do endotélio da aorta dorsal em embrião E18. Notam-se células PAS negativas se soltando do endotélio (seta preta). PAS, 40X/1.3.....	40
Figura 20 – detalhe do assoalho do endotélio da aorta dorsal em embrião de E19, com inclusões negativas para PAS (setas pretas). PAS, 40X/1.3NA.....	40
Figura 21 – células da crista neural positivas para PAS, em embrião E20. PAS, 40X/1.3NA.....	40
Figura 22 – visão panorâmica da região AGM. E16-17. PAS, 10X/0.25NA.....	41
Figura 23 – mesmo campo, aquisição da imagem pelo microscópio confocal. E16-17. PAS, 10X/0.25 NA.....	41
Figuras 24 e 25 – Membrana basal do endotélio positiva. Notar periferia da notocorda também positiva na fig. 24. E 19+20. PAS 40X/1.3.....	42
Figura 26 – subendotélio da aorta positivo. E19. PAS. 40X/1.3.....	42
Figura 27 – aumento da inclusão negativa do endotélio da aorta. E16-17. PAS 40X/1.3.....	42
Figura 28 – maior aumento da imagem anterior. E16-17. PAS 40X/1.3.....	42
Figura 29 – aumento da notocorda, notar matriz extracelular associada à notocorda positiva. E19. PAS40X/1.3.....	42
Figura 30 – secção transversal de embrião E-20 na altura da região AGM. AB pH 1.0, 10X/0.25NA.....	44
Figura 31– secção transversal de embrião E20, na altura da região AGM. AB pH 2.5,10X/0.25NA.....	44
Figura 32 – detalhe do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E20. AB pH1.0 20X/0.45NA.....	45
Figura 33 – detalhe do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E20. AB pH2.5, 20X/ 0.45NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural.....	45
Figura 34 – detalhe de grupamentos celulares no endotélio da aorta dorsal de embrião E19 (setas). AB pH1.0, 40X/1.3NA.....	46

Figura 35 – detalhe de grupamentos celulares do endotélio da aorta dorsal e AB positivo no mesênquima abaixo da aorta dorsal, em embrião E19 (setas). AB pH 2.5, 40X/ 1.3NA.....	46
Figura 36 – parte do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E21. Percebe-se AB positivo na periferia da notocorda (seta). AB pH 1.0, 20X/ 0.45NA.....	47
Figura 37 – parte do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E21. Percebe-se AB bem positivo na periferia da notocorda (seta), mesênquima e subendotelial da aorta (seta) dorsal. AB pH 2.5, 20X/ 0.45NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN:tubo neural.....	47
Figura 38 – mesênquima ABR. E17. 40X/1.3NA.....	51
Figura 39 – notar forte expressão de ABR na periferia da notocorda e expressão subendotelial na aorta dorsal. E20. 40X/1.3NA.....	51
Figura 40 – Expressão de ABR na periferia e superfície luminal do tubo neural. E20. 40X/1.3NA.....	51
Figura 41 – notar a expressão de ABR entre a notocorda e o mesênquima. E20. 40X/1.3NA.....	51
Figura 42 – aumento da notocorda, mostrando menor expressão de ABR na sua periferia em embrião E24-25. 40X/1.3NA.....	51
Figura 43 – expressão em forma de “zíper” na superfície luminal das células do tubo neural de PNA. E20. 40X/1.3NA. ME: mesênquima, AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural.....	51
Figuras 44 e 45 – mesodermas laterais positivos para PNA. E20. 40X/1.3NA.....	52
Figuras 46 e 47 – sem expressão de PNA na aorta dorsal de embriões E20. 40X/1.3NA. ML: mesoderma lateral; AD: aorta dorsal.....	52
Figura 48 – notocorda negativa para PNA. E24-25. 40X/1.3NA.....	53
Figura 49 – superfície luminal das células do tubo neural positivas para PNA. E24-25. 40X/1.3NA.....	53
Figura 50 – notocorda negativa, porém mesênquima positivo para BSI. Notar região perinuclear das células do mesênquima positivas (seta). E17. 40X/1.3NA.....	53
Figura 51– expressão de LCA na periferia da notocorda e tubo neural. E20-21. 40X/1.3NA.....	53

Figura 52 – expressão subendotelial para LCA na aorta de E19+20. 40X/1.3NA.....	53
Figura 53 – endotélio e grupamentos celulares da aorta dorsal positivos para PNA. 40X/1.3NA. Not: notocorda; TN: tubo neural; ME: mesênquima; AD: aorta dorsal.....	54
Figura 54 – fraca expressão de RCA no subendotélio da aorta dorsal e na periferia da notocorda. E20. 40X/1.3NA.....	54
Figura 55 – periferia e células da superfície luminal do tubo neural positivos para RCA; periferia da notocorda também positiva. E20. 40X/1.3NA.....	54
Figura 56 – mesênquima positivo para RCA e periferia da notocorda. E24-25. 40X/1.3NA.....	54
Figura 57 – periferia do tubo neural e células da superfície luminal positivas para RCA. E20-21. 40X/1.3NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural; ME: mesênquima.....	54
Figura 58 – fibronectina positiva no mesoderma lateral. E18.....	56
Figura 59 – endoderma das ilhotas de Wolff-Pander do saco vitelínico positivas para fibronectina. E18.....	56
Figura 60 – expressão de fibronectina na região subendotelial da aorta dorsal, principalmente no assoalho da aorta. E16-17.....	56
Figura 61 – mesmo padrão de expressão da fibronectina, em E18.....	56
Figura 62 – expressão de fibronectina na matriz que circunda a notocorda, o tubo neural e nos somitos. E16.....	56
Figura 63 – aumento do assoalho da aorta, com visível grupamento de células se destacando do endotélio, positivo para fibronectina. E16-17. ML: mesoderma lateral; IL: ilhota do saco vitelínico; AD: aorta dorsal; SO: somitos; TN: tubo neural; Not: notocorda.....	56
Figura 64 – intestino primitivo positivo para desmina . E16-17.....	58
Figura 65 – negativo para desmina na aorta dorsal e na notocorda. E18.....	58
Figura 66 – expressão de α -actina de músculo liso no saco vitelínico. E16-17.....	58
Figura 67 – expressão subendotelial de α -actina de músculo liso no assoalho da aorta (seta) e nos lados. E16-17.....	58
Figura 68 – células internas do tubo neural positivas para GFAP. E20-21.....	58
Figura 69 – células da superfície luminal (seta) do tubo neural positivas para GFAP. E16-17. IP: intestino primitivo; AD: aorta dorsal; Not: notocorda; SV:	

	saco vitelínico; TN: tubo neural.....	58
Figura 70 –	expressão de BMP-4 na notocorda, entre as células e na superfície luminal do tubo neural. E20-21.....	60
Figura 71 –	BMP-4 positivo no saco vitelínico. E20-21.....	60
Figura 72 –	fraca expressão de BMP-4 no subendotélio do assoalho da aorta dorsal. E16-17.....	60
Figura 73 –	expressão de BMP-4 no interior e periferia da notocorda. Expressão da molécula no endotélio e subendotélio da aorta, em todas as suas regiões. Mesênquima também positivo. E20-21. TN: tubo neural; SV: saco vitelínico; AD: aorta dorsal; ME: mesênquima.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lectinas e os resíduos de carboidratos por elas reconhecidos.....	28
Tabela 2	Relação das lectinas estudadas e a localização de estruturas marcadas em secções de embriões de galinhas com estádios de evolução entre E16 a E25.....	50
Tabela 3	Tipos de carboidratos marcados através da reação de PAS e de colorações AB 1.0 e AB 2.5, de acordo com Culling (1974).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABR –	<i>Abrus precatorius</i>
AGM –	Aorta-gônada-mesonefros
BMP-4–	Proteína morfogenética de osso 4
BSI –	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>
d.d–	Dias de desenvolvimento
E–	Estádio
EHT–	Transição endotélio-hematopoiético
GFAP–	Proteína fibrilar ácida glial
HSC–	Células-tronco hematopoiéticas
LCA–	<i>Lens culinaris</i>
PNA–	<i>Arachis hypogaeae</i>
RCA–	<i>Ricinus communis</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1.	CARBOIDRATOS, LECTINAS E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	25
2.	OBJETIVO GERAL.....	29
2.1	Objetivos específicos.....	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Coleta dos embriões e estadiamento.....	30
3.2	Processamento das secções para colorações de campo claro e análise ao microscópio.....	30
3.3	Processamento das secções para colorações de campo claro e análise ao microscópio.....	30
3.4	Técnica de fluorescência com lectinas fluoresceinadas	31
3.5	Técnica de imunofluorescência.....	31
4.	RESULTADOS.....	33
4.1	Análise dos embriões a partir de secções parafinadas seriadas, coradas por Hematoxilina-Eosina e analisadas no microscópio de campo claro.....	33
4.2	Análise das secções parafinadas submetidas à reação de imunohistoquímica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) no microscópio de campo claro e confocal.....	36
4.3	Análise das secções seriadas coradas por Alcian Blue (AB) p.H 1.0 e contracoradas com Hematoxilina de Mayer, em microscópio de campo claro.....	43
4.4	Análise das secções seriadas coradas por Alcian Blue (AB) p.H 2.5 e contracoradas com Hematoxilina de Mayer, em microscópio de campo claro.....	43
4.5	Análise das secções seriadas após marcação com lectinas fluoresceinadas.....	48
4.6	Análise das secções parafinadas submetidas à imunofluorescência, com anticorpos para fibronectina e analisadas por microscopia confocal de varredura a laser.....	55
4.7	Análise das secções parafinadas de embriões submetidos à imunofluorescência com anticorpos contra moléculas de citoesqueleto	

	e analisados por microscopia de varredura a laser.....	57
4.8	Análise das secções parafinadas que passaram por imuofluorescência, com anticorpos para superfície celular e analisados por microscópio confocal de varredura a laser.....	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO A – Comitê de Ética em pesquisa com animais.....	76
	ANEXO B – Artigo submetido à revista científica.....	78

INTRODUÇÃO

A hematopoese constitui um processo altamente complexo de formação e de amadurecimento das diversas células sanguíneas para a manutenção da homeostase do organismo. Todas as células hematopoiéticas têm uma origem comum, ou seja, derivam de uma única célula-mãe, totipotente, chamada célula tronco (“stem cell”) hematopoética (HSC). Estas células têm como característica principal a capacidade de auto-renovação e a pluripotencialidade.

Após estímulos apropriados, as HSCs dão origem a um compartimento de células já comprometidas com determinadas linhagens celulares. Estas são chamadas de células progenitoras, por terem capacidade de formar colônias específicas *in vitro*, e podem ser de dois tipos: mielóide e linfóide as quais, por sua vez, diferenciam-se em células progressivamente mais comprometidas com células terminais. (Fig. 1) (Silveira, 2000).

O microambiente no qual este processo está inserido é fundamental para uma hematopoese eficaz. Nesse sentido, são necessários microambientes diferentes para seu desenvolvimento, sendo um favorável à manutenção da auto-renovação das células tronco e outro voltado para a diferenciação e maturação dos diferentes tipos celulares que darão origem às células sanguíneas. As células-tronco e progenitoras hematopoiéticas ligam-se fortemente a componentes da matriz extracelular como sulfatos de heparina, quimiocinas, colágenos, lamininas, trombospondina-1 e fibronectina, entre outros. As moléculas de adesão nas HSCs e células progenitoras que mediam a ligação aos componentes da matriz extracelular incluem as integrinas, selectinas e mucinas. A aderência das células ao microambiente pode iniciar novos processos de sinalização e alterações bioquímicas intracelulares (Silva et al., 1995). Esse microambiente é constituído por uma rede microfibrilar complexa e por outros tipos celulares que tem por função a sustentação das células hematopoéticas.

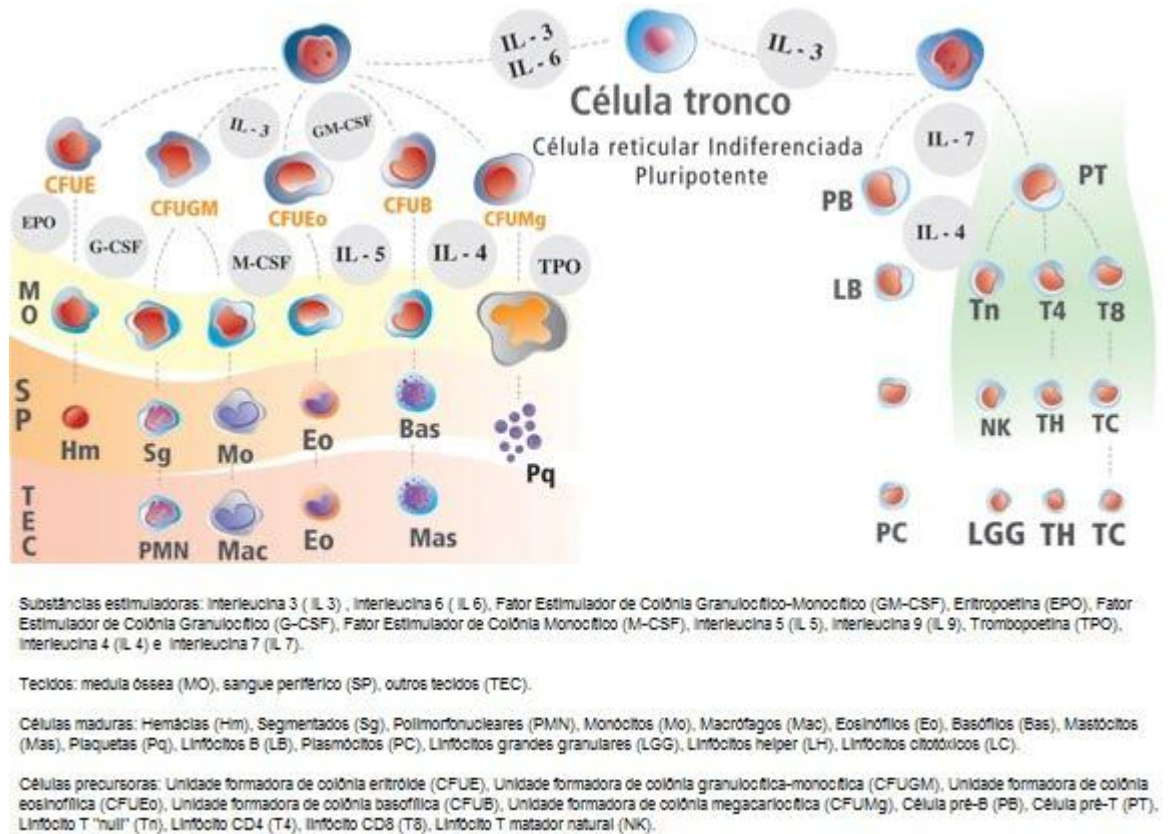


Figura 1: Substâncias estimuladoras e diferenciação das células tronco hematopoéticas.

A ontogenia do sistema hematopoético é ainda investigada basicamente através de observações histológicas dos tecidos embrionários e fetais, e várias observações sugerem diferenças funcionais, relacionadas ao processo ontogenético, entre populações de células primitivas. As células do saco vitelino, região para-aórtica e fígado fetal são capazes de produzir colônias de baço em animais adultos irradiados, mas a origem das célula-tronco estáveis aí presentes ainda não é totalmente conhecida (Dieterlen-Lièvre e Martin, 1981).

Tradicionalmente, de acordo com Maximov (1909), acreditava-se que o sítio de origem da hematopoiese seria as ilhotas de Wolff-Pander no saco vitelínico, devido à fácil visualização de grupamentos de eritrócitos circundados por endotélio primitivo, os quais emergem da diferenciação dos hemangiocitoblastos, células que compõem estas ilhotas. Estas células teriam inicialmente a mesma morfologia e, à medida que o desenvolvimento do embrião prossegue, as células periféricas assumem uma forma achatada, característica de células endoteliais, enquanto que as centrais apresentam-se arredondadas. Dantschakoff (1907) reforçou este conceito ao descrever a hematopoiese associada ao saco vitelínico em aves. Estas observações sobre a mudança de morfologia das células do saco vitelínico levaram os embriologistas a sugerirem que estas ilhotas conteriam os precursores capazes de gerar

tanto as células endoteliais, como as células hematopoiéticas (His, 1900; Murray, 1932; Sabin, 1920).

Em 1916, Jordan observou grupamentos de células na parede da aorta em embriões de galinha, porco, tartaruga e mangusto-anão, o que ele descreveu como um padrão comum durante o desenvolvimento de vertebrados. Denominando estas células de “hemoblastos”, Jordan propôs que estas seriam produtos da diferenciação endotelial da aorta. Assim, a célula endotelial mudaria sua forma, perdendo seu formato pavimentoso característico e tornando-se fusiforme, com uma protuberância unilateral característica de fase de destacamento do endotélio da aorta, além de um núcleo “inativo” (SIC). De acordo com este autor, os grupamentos de células na aorta surgiriam por invaginação do endotélio e ocorreriam devido à capacidade inerente do endotélio de produzir células sanguíneas, o que o levou a propor o conceito de “endotélio hemogênico”.

No entanto, Moore & Owen (1967a) elaboraram experimentos no saco vitelínico de embriões de galinhas e observaram que as células-tronco nele produzidas em estágios iniciais de desenvolvimento, posteriormente migrariam para os órgãos hematopoiéticos rudimentares do embrião (fígado fetal, timo e baço), o que seria a base da teoria centrípeta proposta por estes autores. A medula óssea, após ser colonizada por estas células, passaria a ser a reserva das células-tronco por toda a vida do animal (Moore & Owen, 1967b).

Na tentativa de descobrir a origem das primeiras células hematopoiéticas, Martin (1972) e Diertelen-Lievre et al (1975) elaboraram experimentos envolvendo quimeras de galinhas-codornas. Nestes, embriões de codorna foram inseridos no interior de sacos vitelínicos de galinha. Contrariando a teoria centrípeta proposta por Moore & Owen, os órgãos hematopoiéticos foram colonizados por células da codorna, no dia 5 d.d. (dias de desenvolvimento). No dia 13 d.d., 70% das células sanguíneas circulantes eram de origem da codorna em algumas quimeras e não do saco vitelínico. Portanto, de acordo com os autores, a origem das células hematopoiéticas definitivas seria em sítio intra-embriônico e não no saco vitelínico.

Medvinsky e Dzierzak (1996) observaram que as primeiras células-tronco apareceram na região Aorta-Gônada-Mesonefros (AGM) em estudos *in vitro*. De Bruijn et al (2000) notaram também que células-tronco oriundas desta região eram capazes de colonizar a medula óssea de ratos adultos. Takeuchi et al (2002) conseguiram manter, *in vitro*, células-tronco hematopoiéticas a partir de cultivo de região AGM dissecada de embriões de galinha. No entanto, por muito tempo permaneceu desconhecida qual seria a porção da AGM responsável pela origem destas células-tronco hematopoiéticas.

A origem das células-tronco hematopoiéticas ficou por muitos anos entre duas correntes: se estas surgiriam do próprio endotélio da aorta (endotélio hemogênico) ou se existiria um precursor embrionário bipotente, capaz de gerar células sanguíneas e o endotélio (o hemangioblasto). A visão mais atual aceita em relação a este tópico é que durante o desenvolvimento do embrião a célula-tronco hematopoiética originaria as células de músculo liso e o endotélio hemogênico. O endotélio hemogênico seria então um estágio transitório, a partir do qual surgiriam células hematopoiéticas primitivas e definitivas, com fenótipo CD41 e CD 45 positivos, caracterizando o que alguns autores denominam de transição endotélio-hematopoiético, “EHT” (Gordon-Keylock e Medvinsky, 2011) (fig. 2).

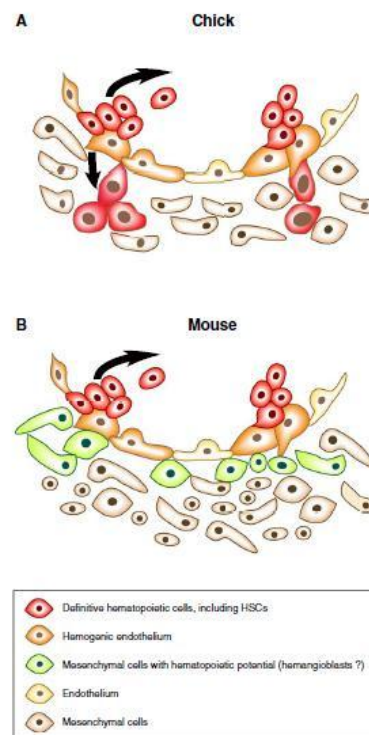


Fig. 2: populações celulares na aorta dorsal em embriões de galinha e de rato. Fonte: Jaffredo et al, 2005.

A aorta dorsal é formada a partir de dois tecidos embrionários: o mesoderma da esplancnopleura e os somitos. O primeiro origina o assoalho aórtico (face ventral; endotélio em oposição à notocorda), enquanto os somitos dão origem ao teto (face dorsal; lado adjacente à notocorda) e aos lados da aorta (Pardanaud et al 1996; Pardanaud e Diertelen-Lièvre, 1999). De acordo com os esses autores, o mesoderma da esplancnopleura teria

capacidade de gerar tanto precursores endoteliais quanto hematopoiéticos, diferentemente dos somitos que seriam capazes somente de dar origem ao endotélio aórtico (fig. 3).

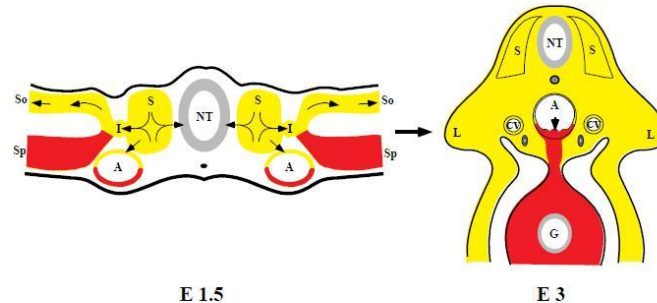


Fig. 3: Os dois tecidos embrionários que formam a aorta dorsal. Em amarelo, o somito (So); em vermelho, o mesoderma da esplancnopleura (Sp). NT: tubo neural; I: massa de células intermediárias; So: somatopleura; A: aorta; CV: veias cardinais; G: intestino; L: broto do membro. Fonte: Pardanaud *et al*, 1996.

A aorta é originada por células de músculo liso, oriundas do esclerótomo. Porém, Wiegrefe et al (2007) propôs que a formação das primeiras células de músculo liso do assoalho da aorta na galinha não são de origem somática, mas sim de uma população transitória de células originárias do mesoderma esplâncnico. Estas células gradativamente seriam substituídas por células oriundas do esclerótomo. A partir destes dados, o grupo sugeriu que células de origem esplâncnicas transitórias migrariam através do endotélio aórtico e adotariam um fenótipo de células de músculo liso, as quais seriam gradativamente substituídas por células secundárias, oriundas do esclerótomo.

Com o intuito de elucidar a origem embrionária na aorta dorsal, através dos estudos de linhagens celulares, Wiegrefe et al (2007) e Pouget et al (2008), montaram quimeras de galinha e codorna. Quando metade do somito ventral (esclerótomo) de codorna foi enxertado na galinha no dia 2 d.d., observou-se que células da codorna são detectadas no lado ventral e lateral do vaso no dia 3 d.d. O assoalho da aorta dorsal no dia 3 d.d. expressa α -actina de músculo liso fortemente, região que anteriormente não apresentou células do enxerto. No dia 4 d.d., células da codorna foram encontradas no teto, lados laterais e no assoalho da aorta, integradas à túnica média do vaso e também apresentaram expressão de α -actina de músculo liso. Para estes autores, este dado sugeriu que as primeiras populações de células de músculo liso do assoalho da aorta dorsal são na verdade oriundas de outra fonte embrionária.

Dietelen-Lièvre et al (2006) mostraram grupamentos celulares presentes na parede da aorta dorsal que se projetaram no lúmen do vaso. Sua natureza hematopoiética foi confirmada por experimentos de imunohistoquímica MB1/QH1 e pelo uso de anticorpos anti-CD45. Estes

grupamentos celulares depois de entrar na corrente sanguínea originaram colônias eritróides, monocíticas, mielóides ou multipotentes (Cormier, Dieterlen-Lièvre, 1986, 1988, Cormier, 1993).

Em estudos realizados com mamíferos, também foram observadas evidências que sugeriram o surgimento do endotélio hemogênico. Grupamentos celulares da aorta dorsal foram observados por microscopia eletrônica por Marshall e Thrasher (2001). Este estudo mostrou que estes grupamentos celulares apresentaram junções íntimas com células do endotélio da aorta.

Atualmente, acredita-se que as células-tronco hematopoiéticas emergem do lado ventral da aorta dorsal da ave, porém há duas correntes de hipóteses diferentes sobre para onde estas células migrariam após seu surgimento. Alguns grupos acreditam na existência do endotélio hemogênico, que seria um grupo especial de células endoteliais que se destacariam em determinado momento no desenvolvimento do embrião e adentrariam na circulação. Algumas destas células endoteliais mudariam o seu fenótipo e tornariam-se as células-tronco hematopoiéticas. Outra corrente de pesquisadores (Cumano et., 1996) acredita na emergência *de novo* de células mesenquimais, ou seja, precursores hematopoiéticos surgiriam no mesênquima e migrariam em direção à luz da aorta.

Na região AGM de embriões de ratos e galinhas, foram ensaiados alguns anticorpos com o intuito de caracterizar o fenótipo das células do endotélio da aorta dorsal e de tentar identificar a emergência das células-tronco hematopoiéticas. Bertrand et al (2005) mostraram em seu trabalho que este endotélio tem expressão positiva para c-kit, AA4.1, CD31, CD41 e negativa para CD34, CD45 e VEGF-R2. Jaffredo et al (1998) mostraram que grupamentos celulares da aorta dorsal possuíam fenótipo VEGF-R2+ / CD45- quando ainda mostravam-se ligados ao endotélio e que este fenótipo se alterava para VEGF-R2- / CD45+ quando se destacavam do endotélio. Jaffredo et al (2005) destacaram a perda de expressão de VE-caderina pelo endotélio em embriões de galinhas de estádios E17, E19 e E21. É descrita também a expressão de fatores de transcrição como Runx-1 e c-myb no endotélio da aorta e em grupamentos celulares intraluminais. Runx-1, inclusive, foi identificado como um elemento necessário para a formação destes grupamentos intra-aórticos, sugestivos de atividade de endotélio hemogênico (Swiers et al, 2010).

Habitualmente, para definir o fenótipo de células endoteliais de diferentes sítios, utilizam-se algumas ferramentas bioquímicas, tais como a reação histoquímica de Ácido Periódico com o Reagente de Schiff (PAS), que mostra no tecido a presença de glicogênio, polissacarídeos, mucosubstâncias neutras e membranas basais, além de lectinas conjugadas a

um marcador fluorescente (Carson e Hladik, 2009).

1. OS CARBOIDRATOS, AS LECTINAS E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Os papéis biológicos desempenhados pelos carboidratos são particularmente importantes na montagem de órgãos complexos e de organismos multicelulares, os quais requerem interação entre as células e a matriz circundante. Todas as células e numerosas macromoléculas na natureza apresentam uma variedade de açúcares (monossacarídeos) ou cadeias de açúcares (oligossacáridos) covalentemente ligados. Como a maioria dos açúcares estão na superfície externa das células ou em macromoléculas secretadas, eles podem participar na modulação ou mediação de uma grande variedade de eventos célula-célula, célula-matriz e célula-molécula, que são interações críticas para o desenvolvimento e a função de um organismo multicelular complexo. Eles também podem atuar como mediadores nas interações entre diferentes organismos (por exemplo, entre o hospedeiro e um parasita ou um simbiote). (Varki e Sharon, 2009).

As classes mais comuns de carboidratos encontrados nas células eucarióticas são inicialmente definidas de acordo com a natureza da porção não carboidrato ligada (proteína ou lipídio) (Fig. 4). Por exemplo, uma glicoproteína é um glicoconjugado no qual a proteína apresenta um ou mais açúcares ligados covalentemente a um arcabouço proteico (Varki e Sharon, 2009).

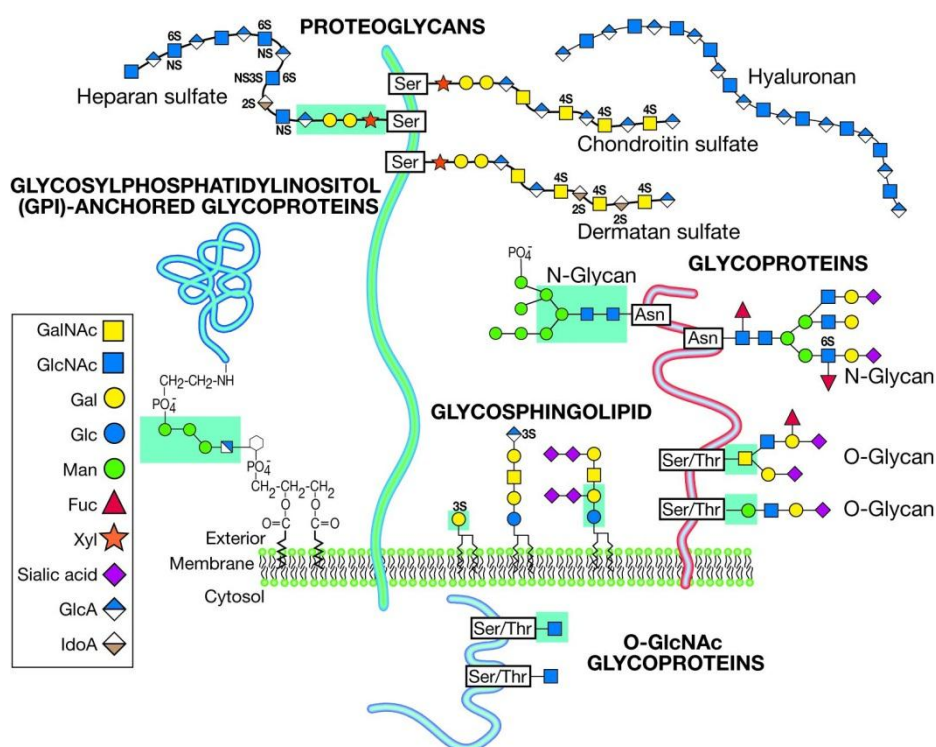


Figura 4: Principais classes de glicanas animais. (Modificado de Varki, 1997; Fuster e Esko,

2005).

Devido a sua onipresença e a sua complexa variedade nas superfícies celulares, não é surpreendente que os carboidratos desempenhem diferentes papéis fisiológicos em organismos multicelulares. Utilizando-se anticorpos específicos ou lectinas, foi demonstrado que os carboidratos apresentam um padrão de expressão temporal e espacial específico com função de ativação celular, desenvolvimento embrionário, organogênese e diferenciação. Certas alterações relativamente específicas na expressão de glicanos são também muitas vezes encontradas durante a transformação e progressão para malignidade, bem como outras situações patológicas, tais como a inflamação. Esses padrões espacialmente e temporalmente controlados implicam no envolvimento de glicanos em muitos processos normais e patológicos. Por exemplo, existem evidências consideráveis que glicosaminoglicanos apresentam papel na modulação da angiogênese e o ácido hialurônico tem um papel importante no desenvolvimento do coração (Varkiet al., 2009).

As glicosaminoglicanas são cadeias polissacarídicas lineares, com repetições dissacarídeas, que são sempre um amino açúcar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina). São estruturas negativas por possuírem grupos carboxil e sulfato. As principais glicosaminoglicanas encontradas são as hialuronanas, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, heparan sulfato e o sulfato de queratan. A hialuronana ou ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não-sulfatado muito abundante no início do desenvolvimento em embriões e em todos os tecidos do adulto. O heparan sulfato se liga aos fatores de crescimento de fibroblastos aumentando a sua atividade no tecido (Carson e Hladik, 2009).

Os proteoglicanos são produzidos pela maioria das células animais; são sulfatados, portanto moléculas negativas. Alguns proteoglicanos não são secretados para a matriz extracelular, sendo componentes de membrana plasmática. Atuando como receptores, promovem a ligação da célula à matriz extracelular ou iniciam a resposta celular a alguma proteína sinalizadora. Tanto as glicosaminoglicanas quanto os proteoglicanos podem se associar formando um complexo polimérico na matriz extracelular. Além disso, estas moléculas podem se associar ao colágeno e à lâmina basal (Carson e Hladik, 2009).

Uma ferramenta para a visualização de glicosaminoglicanas é a coloração por Alcian Blue (AB) em diferentes condições de pH, habitualmente, pH 1,0 e pH 2,5. Através do Alcian-Blue pH 1,0 é possível observar mucosubstâncias sulfatadas, tais como sulfato de condroitina do tipo A e do tipo C (presentes em cartilagem, condrossarcomas, córnea e vasos sanguíneos),

do tipo B ou dermatan sulfato (na pele, tecidos conjuntivos, pulmão e aorta) e a heparina (em mastócitos e na região íntima de artérias). Esta coloração, em pH 2,5, mostra mucopolissacarídeos ácidos, como o ácido hialurônico, encontrado normalmente em tecidos conjuntivos e cordão umbilical (Carson e Hladik, 2009).

Interações entre leucócitos e as células endoteliais em locais de inflamação podem ser mediadas por ligações entre carboidratos e lectinas (Sharon, 1995). Este autor postula que estas interações também podem ser importantes no estabelecimento de metástases e conclui que estudos centrados nestas ligações carboidratos-lectinas podem ser importantes no desenvolvimento de drogas anti-adesão que poderiam auxiliar no tratamento de doenças inflamatórias e neoplásicas.

As lectinas são (glico)proteínas que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos (Peumans e Van Damme, 1995). O interesse destas moléculas na investigação científica se deve às diversas atividades biológicas a elas atribuídas. Além da identificação de grupos sanguíneos, da caracterização de micro-organismos e da estimulação mitogênica de células imunes, as lectinas estão envolvidas nos processos de reconhecimento e das interações celulares. São conhecidas também por mediar processos transitórios de adesão célula-célula em processos de coagulação, inflamação, interação espermatozóide-óvulo, recirculação de linfócitos, sinalização intracelular de proteínas recém-sintetizadas, adesão celular e reconhecimento celular (Alberts et al., 2002).

Amplamente distribuídas na natureza, são encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e micro-organismos (Lis e Sharon, 1986; Mody et al., 1995; Mody et al 1995, Kennedy et al., 1995), sendo freqüentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares (Sharon e Lis, 1989). Estas moléculas, por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (Misquith et al., 1994). Desta forma, as lectinas vêm sendo utilizadas na investigação científica como uma ferramenta útil na avaliação e no entendimento de diversos sistemas biológicos (Rudiger, 1998). Algumas das lectinas e os resíduos de carboidratos por elas reconhecidos são apresentados na tabela (1) a seguir (Wu et al., 2009).

Lectina	Resíduo de Açúcar
<i>Abrus precatorius</i> (ABR)	Galbeta1-3 GalNAc
<i>Arachis hypogaeae</i> (PNA)	Gal
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> (BSI)	Galalfa1-3Gal
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	Man e/ou Glc
<i>Ricinus communis</i> (RCA)	Galbeta1-3/4GlcNAcbeta1

Tabela 1: lectinas e resíduos de carboidratos

Algumas lectinas já foram bem estudadas e utilizadas em estudos de reconhecimento de carboidratos em vários tecidos animais. Estas lectinas normalmente estão ligadas a um fluoróforo, como rodamina e fluoresceína.

Revisando-se trabalhos realizados utilizando-se as lectinas como ferramenta para estudar a expressão de açúcares em modelos animais, percebe-se que em camundongos a lectina mais utilizada é a *Griffonia simplicifolia*, assim como a *Ulex europeus* (UEA) em humanos. Em embriões de galinha, há alguns estudos de distribuição de açúcares utilizando-se lectinas. Por exemplo, Nico et al (1998) estudaram a microvasculatura do teto óptico de embriões de galinhas de 9, 14, 20 e 30 dias de desenvolvimento, utilizando lectinas ligadas à ouro coloidal e peroxidase de raiz-forte. Nico et al encontraram a presença de β -D-galactose (reconhecida por *Ricinus communis*) N-acetylglucosamine e resíduos de ácido siálico (lectina de Wheat germ – WGA) em capilares de estágios iniciais de desenvolvimento. Também há expressão de β -D-galactose no citoplasma de células endoteliais em embriões de 9 dias de desenvolvimento, em junções íntimas e na membrana basal de embriões de 14 e 20 dias de desenvolvimento, quando analisados ultraestruturalmente. Esses resultados indicam que o teto óptico adquire polaridade funcional precocemente no seu desenvolvimento e que glicoconjugados contendo resíduos de β -D-galactose estão envolvidos na composição química das junções comunicantes e na membrana basal, as quais são consideradas estruturas chave para a diferenciação da barreira hematoencefálica.

No entanto, não há na literatura estudos sobre o fenótipo endotelial da aorta dorsal de embriões de galinha no que tange à expressão de açúcares e moléculas correlatas, da mesma forma que há pouca abordagem desta natureza sobre a região AGM como um todo.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a região AGM (Aorta-Gônadas-Mesonefros) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. em estádios de evolução compreendidos entre E16 e E25 de Hamburger & Hamilton (1951), focalizando principalmente a aorta dorsal e o fenótipo de seu endotélio.

2.1 Objetivos específicos

Estudar, em embriões de galinha de estágios E16 a E25, fixados em formalina tamponada, incluídos verticalmente em blocos de parafina e cortados serialmente na altura da região AGM:

- A distribuição de glicoproteínas neutras, glicosaminoglicanos e fibronectina na matriz extracelular;
- A presença de α -actina de músculo liso, desmina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como componentes de citoesqueleto;
- A expressão dos seguintes carboidratos: Galactose α 1-3 galactose, Manose, Glicose, Glicose N-acetilglucosamina β 1, Galactose β 1-3 Galactose N-acetilglucosamina, através de marcação pelas seguintes lectinas fluoresceinadas: *Abrus Precatorius* (ABR), *Arachis hypogaeae* (PNA), *Bandeireae simplicifolia* (BSI), *Lens culinaris* (LCA) e *Ricinus communis* (RCA).
- A expressão de BMP-4 (bone morphogenetic protein 4).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta dos embriões e estadiamento

Dezenove ovos recém-galados de *Gallus gallus domesticus* L. da raça White Leghorn foram postos em chocadeira, com temperatura de 37°C e umidade de 60% mantidas constantes. Após 3 a 4 dias de desenvolvimento, esses ovos passaram a ser observados através de ovoscópio. Dentro desse período, os embriões foram então retirados dos ovos e estadiados com o auxílio de uma lupa, com base na classificação de Hamburguer & Hamilton (1951). Após o estadiamento, os embriões foram seccionados com um corte transversal abaixo da artéria onfalo-mesentérica, dividindo-o em duas partes, e fixados em Formalina Millonig de Carson por 24 horas. Em seguida, os embriões passaram por processamento histológico automatizado em histotécnico Citadel 2000 (Shandon) e inclusão das duas secções no mesmo bloco (em estação de inclusão Histocentre 2, Shandon), com o cuidado de manter as duas secções em posição vertical durante a inclusão em parafina. Os blocos assim produzidos foram encaminhados para seccionamento seriado em micrótomo rotativo manual (RM2125RT, Leica) para obtenção de cortes sequenciais de 5µm, os quais foram repousados sobre lâminas histológicas de vidro revestidas com adesivo (albumina ou silano). Para avaliação da topografia anatômica do seccionamento, a cada dez secções uma era submetida à coloração por Hematoxilina-Eosina.

3.2 Processamento das secções para colorações de campo claro e análise ao microscópio

Parte das lâminas cuja topografia era consistente com a região AGM passou por outras colorações histológicas para microscopia de campo claro, tais como: PAS, PAS-diafase, Alcian Blue pH 1,0 e Alcian Blue pH 2,5. Estas secções foram observadas através do microscópio invertido de campo claro AxioObserver Z1 (Zeiss), equipado com lentes objetivas de alta abertura numérica e documentadas com câmera AxioCam HRc (Zeiss). Imagens digitais foram geradas com resolução de 2776 x 2080 pixel² e arquivadas em extensão TIFF.

3.3 Técnica de fluorescência com lectinas fluoresceinadas

Outra parte das lâminas foi submetida à técnica de reconhecimento de carboidratos por

lectinas fluoresceinadas. Os cortes selecionados para esta técnica foram aderidos a lâminas de vidro previamente revestidas com adesivo silano, desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica em tampão TUF (Zymed) em câmara de aquecimento em alta pressão Pascal (Biogen) ou aparelho tipo doméstico de cozimento a vapor. As seguintes lectinas (Sigma-Aldrich) ligadas diretamente a isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram empregadas: *Lens culinaris* (LCA), *Arachis hypogaeae* (PNA), *Bandeiraeae simplicifolia* (BSI), *Ricinus communis* (RCA) e *Abrus precatorius* (ABR). Como controles positivos da reação destas lectinas foram utilizados cortes histológicos parafinados de blocos de pulmão e rins de camundongos machos normais de idade adulta, blocos estes oriundos da Coleção do Departamento de Patologia – IOC/ Fiocruz.

3.4 Técnica de imunofluorescência

Outras lâminas que também foram previamente revestidas com adesivo silano passaram por técnica de imunofluorescência. Após desparafinização e recuperação antigênica idênticas às aplicadas para o ensaio com lectinas fluoresceinadas, os seguintes anticorpos primários foram utilizados: BMP-4, Desmina, Fibronectina, α -actina de músculo liso e GFAP (BMP-4: Abcam 1:50; Desmina: Thermo 1:100; FN: American Qualex 1:300; alfa-actina: Sigma, 1:300, clone 1 A.4; GFAP: DAKO 1:100). Como reveladores foram utilizados anticorpos secundários conjugados à AlexaFluor 488 (Invitrogen).

Todas as lâminas marcadas com lectinas fluoresceinadas ou que passaram por imunofluorescência foram contracoradas com Azul de Evans e DAPI e posteriormente montadas com meio de montagem ProLong Gold (Invitrogen).

3.5 Análise das lâminas no microscópio confocal

A análise dessas lâminas foi realizada em microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss) equipado com lente objetiva PlanNeofluar 40x/1.3 Oil DIC. Como cada lâmina continha três fluorocromos diferentes (FITC ou AlexaFluor 488, além de Azul de Evans e DAPI), a aquisição de imagem de cada fluoróforo foi realizada separando-os em canais de detecção diferentes. Assim, para a análise de FITC e de AlexaFluor 488, o laser de Argônio de 488nm foi utilizado para estimular a fluorescência; o espelho dicróico utilizado foi o NFT 545, o qual separou os comprimentos de onda emitidos em dois trajetos: os maiores que 545 foram transmitidos e os de interesse, menores que 545nm, foram refletidos em direção a filtro

“bandpass” BP505-530, pelo qual passaram antes de chegar a detector monocromático do tipo fotomultiplicador. Para a excitação do Azul de Evans, usou-se laser de Hélio/Neônio de 543nm. Da mesma forma, o sinal emitido foi separado pelo mesmo espelho dicróico NFT 545, o qual desviou os comprimentos de onda menores que 545nm e transmitiu os comprimentos de onda de interesse, maiores que 545nm, direcionando-os para filtro “longpass” LP570 e em seguida para um fotomultiplicador. Para a leitura do DAPI, por sua vez, o laser utilizado possuía cor violeta, de 405nm. A luz emitida da amostra foi dividida por um espelho dicróico NFT 490, de modo que os comprimentos de onda maiores que 490nm foram transmitidos e os menores que 490nm foram refletidos em direção a filtro “bandpass” BP420-480, até chegar a detector fotomultiplicador. Os três *pinholes* utilizados (um para cada canal) foram ajustados para a aquisição de imagens em resolução de aproximadamente 1.0 *Airy Unit*, ajustada de modo que os cortes tomográficos dos três canais tivessem a mesma espessura. As imagens foram adquiridas com resolução de 2048 x 2048 pixel².

Além de analisadas à microscopia de campo claro, as lâminas submetidas à reação de PAS também foram lidas à microscopia confocal, utilizando-se a mesma configuração empregada para o Azul de Evans, descrita acima (laser HeNe 543nm, DBS NFT 545, LP570). Para essas lâminas, o diâmetro do *pinhole* empregado foi ajustado para uma resolução de exatamente 1.0 *Airy Unit*. As imagens para lâminas com PAS foram adquiridas com a mesma lente objetiva PlanNeofluar 40x/1.3 Oil DIC (Zeiss) e com resolução de 2048 x 2048 pixel².

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos embriões a partir de secções parafinadas seriadas, coradas por Hematoxilina-Eosina e analisadas em microscópio de campo claro

Foram analisadas secções histológicas transversais e seriadas de embriões de galinha de estádios compreendidos entre E16 e E25, topograficamente localizadas na altura da região AGM (Fig. 5) e coradas com Hematoxilina-Eosina. Nestas secções, foi possível observar a aorta dorsal, a notocorda, o tubo neural, o intestino primitivo, os mesonefros, o mesênquima e o saco vitelínico. Tanto nos estádios mais precoces (E17, E18), como nos estádios um pouco mais tardios do desenvolvimento, foi observada hipertrofia endotelial do assoalho aórtico, face da aorta dorsal oposta à notocorda (Figs. 6, 10 e 12). À medida que as secções adquiriram topografia mais caudal, foi percebida também hipertrofia do endotélio nos lados da aorta dorsal, onde apresentava transição abrupta para endotélio plano, não hipertrófico (Figs. 7, 8 e 12). Essa hipertrofia das células endoteliais foi acompanhada de vacuolizações intracelulares volumosas, as quais eram localizadas na região basal, possuindo aspecto de inclusão única e rechaçando o núcleo para a região apical destas células (Fig. 6).

No entanto, não foi observada uma uniformidade quanto à presença das inclusões nas células do endotélio da aorta dorsal, na medida em que estas eram presentes em alguns embriões e ausentes em outros. Quando presentes, as inclusões apareceram tanto em secções mais cefálicas, quanto mais caudais nos embriões.

Eventualmente, foram observadas mitoses no endotélio, bem como grupamentos de células endoteliais aparentemente destacados da membrana basal da aorta em direção à luz do vaso.

A partir dos dados obtidos com as lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina, questionamos qual seria a composição da matriz extracelular da região AGM e também se as inclusões endoteliais da aorta dorsal conteriam ou não glicoproteínas e, em caso positivo, que tipos de carboidratos estariam presentes.

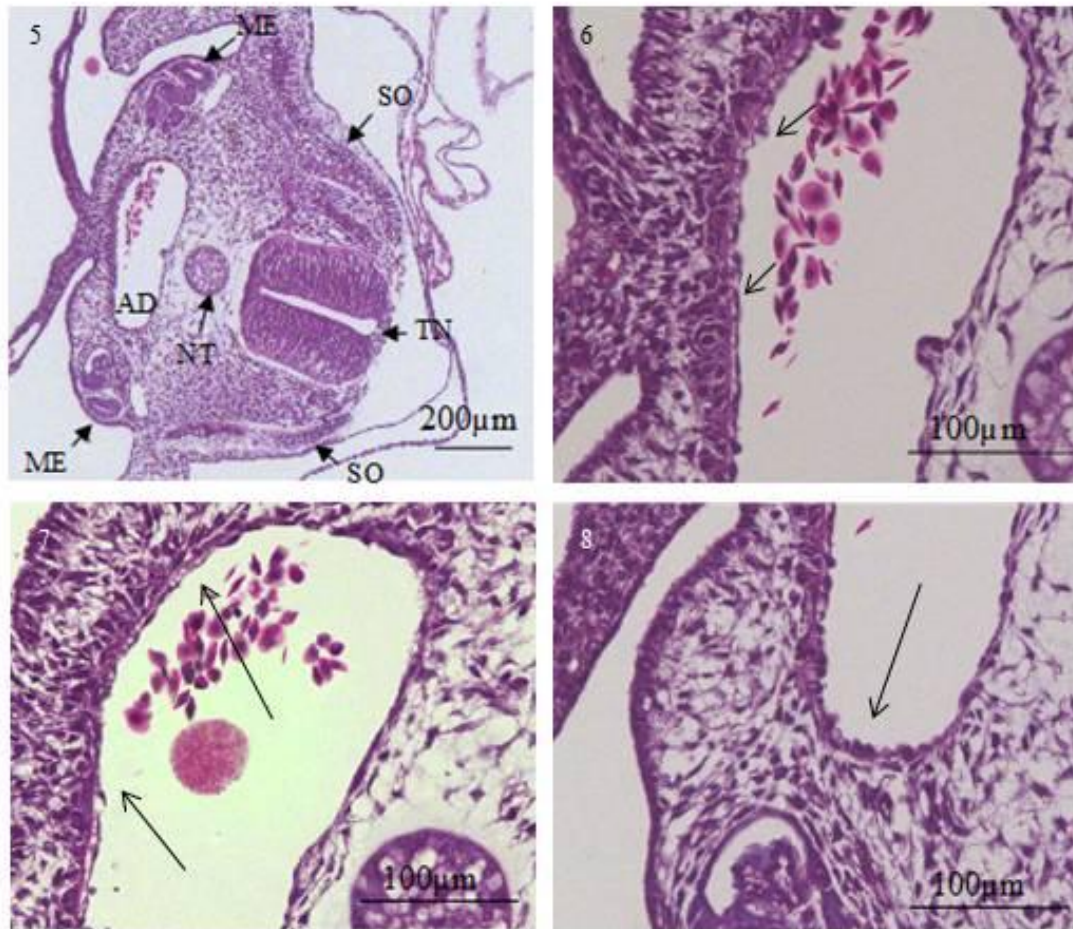


Figura 5: corte transversal de embrião E16-17, na altura da região AGM, HE, 10X/0.25NA. Figura 6: setas apontam detalhe de hipertrofia por todo o endotélio do assoalho da aorta dorsal, contendo vacuolizações - embrião E16-17, 40X/1.3NA, HE. Figura 7: setas apontam detalhe de hipertrofia de um dos lados da aorta dorsal em embrião E 16-17, HE, 40X/1.3NA. Figura 8: seta aponta detalhe de um dos lados de pouca hipertrofia em embrião E 16-17, HE, 40X/1.3NA. AD: aorta dorsal; ME: mesonefros; NT: notocorda; SO: somitos; TN: tubo neural.

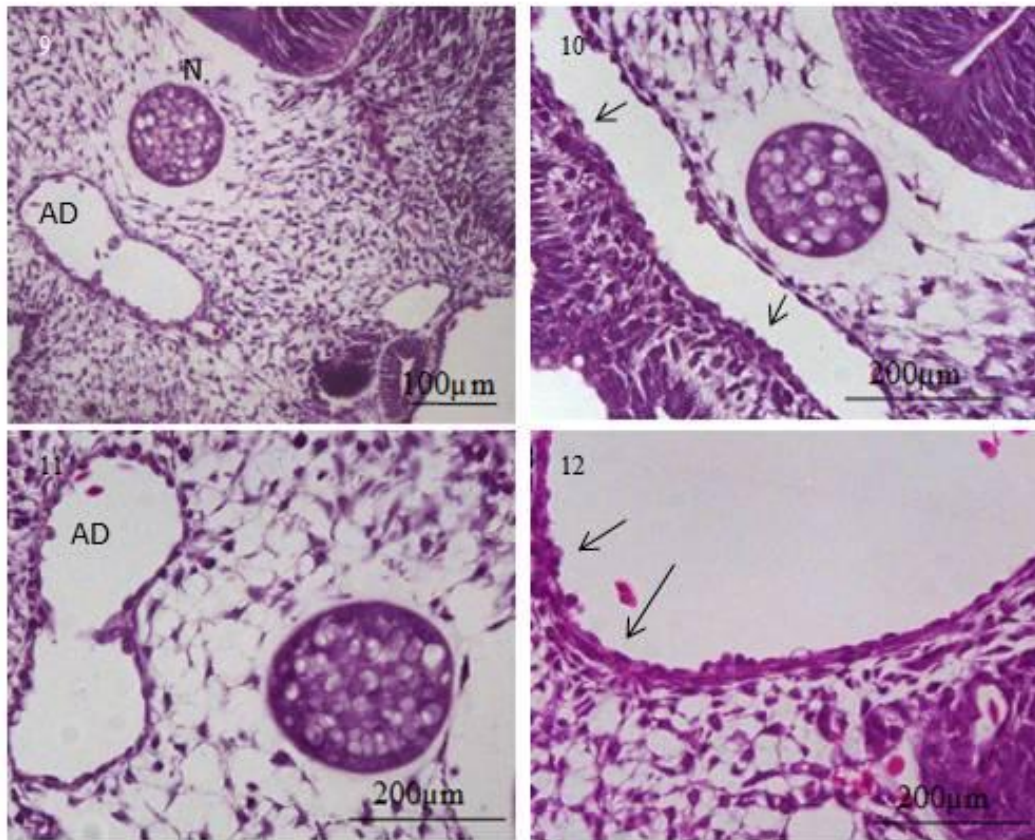


Figura 9: notocorda (N) e aorta dorsal (AD) de embrião E17. HE, 20X/0.45NA. Figura 10: setas apontam detalhe do assoalho hipertrófico da aorta dorsal de embrião E19. HE, 40X/ 1.3NA. Figura 11: detalhe da aorta dorsal em embrião E20. HE, 40X/ 1.3N. Figura 12: setas apontam detalhe do endotélio da aorta dorsal menos hipertrófico, em embrião E21. HE, 40X/ 1.3NA.

4.2 Análise de secções parafinadas seriadas submetidas à reação histoquímica do Ácido Periódico com o Reagente de Schiff (PAS) em microscopias de campo claro e confocal

Em relação à aorta dorsal, foi possível observar que as vacuolizações nas células endoteliais foram PAS negativas, enquanto que o citoplasma destas células foi PAS positivo (Figs. 14 e 15). À medida que estas células se apresentavam desconectadas do endotélio, tornavam-se mais PAS positivas em seu citoplasma, perdendo a vacuolização e adquirindo uma aparência mais arredondada. Em consonância com esse achado, dentro da luz da aorta dorsal observaram-se células PAS fortemente positivas, redondas, que não aparentaram tratar-se de eritrócitos primitivos (Fig. 19).

Nas secções mais caudais, foi observada maior expressão de PAS no assoalho da aorta em comparação com o teto do vaso (face voltada para a notocorda), cujas células endoteliais apresentaram-se PAS fracamente positivas (Fig. 14). A membrana basal do endotélio da aorta dorsal apresentou marcação PAS uniforme e fortemente positiva ao redor e ao longo de todo o vaso (Fig. 13).

Em artéria de embrião de estágio E18, foram observados grupamentos celulares se destacando do endotélio que foram acompanhados de outros grupamentos, de células semelhantes e também PAS positivas, localizados no mesênquima subjacente.

Além da aorta dorsal, outras estruturas mostraram-se marcadas ao PAS (Fig. 13). Por exemplo, células gonadais, de origem da crista neural, foram facilmente identificadas a partir de seu conteúdo citoplasmático intensamente PAS positivo (fig. 21). O endoderma do intestino primitivo, assim como os somitos e o tubo neural (regiões interna e periférica) também se apresentaram marcados, assim como foi verificada uma forte expressão na periferia da notocorda e no coração de todos os embriões, bem como o mesênquima como um todo.

A coloração de PAS precedida de tratamento com diástase revelou resultados muito semelhantes àqueles observados sem o pré-tratamento.

Os sítios positivos à reação de PAS apresentaram fluorescência de cor predominantemente vermelha quando os preparados submetidos a esta reação foram iluminados com luz verde (iluminação por lâmpada de mercúrio HBO em cubo de fluorescência composto por filtro de excitação BP546/12, espelho dicróico DBS FT580 e filtro de emissão LP590). A análise espectral desta emissão, realizada no microscópio confocal com o auxílio do detector META, revelou uma curva unimodal, com pico de

excitação ao redor de 540nm e pico de emissão em cerca de 570nm.

A partir desta propriedade fluorescente do produto final da reação de PAS, analisamos os mesmos preparados à microscopia confocal (figs. 22 e 23), com o intuito de aumentar a resolução e o contraste das estruturas marcadas. Além de ter confirmado os mesmos achados da microscopia de campo claro, esta abordagem facilitou o delineamento da membrana basal da aorta dorsal, confirmou a negatividade das inclusões endoteliais (figs. 27 e 28) e permitiu um melhor detalhamento da matriz extracelular associada à notocorda (fig. 29).

Questionamos então qual seria a distribuição de glicosaminoglicanas de alta e de baixa sulfatação na região AGM. Para isso analisamos lâminas coradas com Alcian Blue pH 1.0 e Alcian Blue pH 2.5, respectivamente.

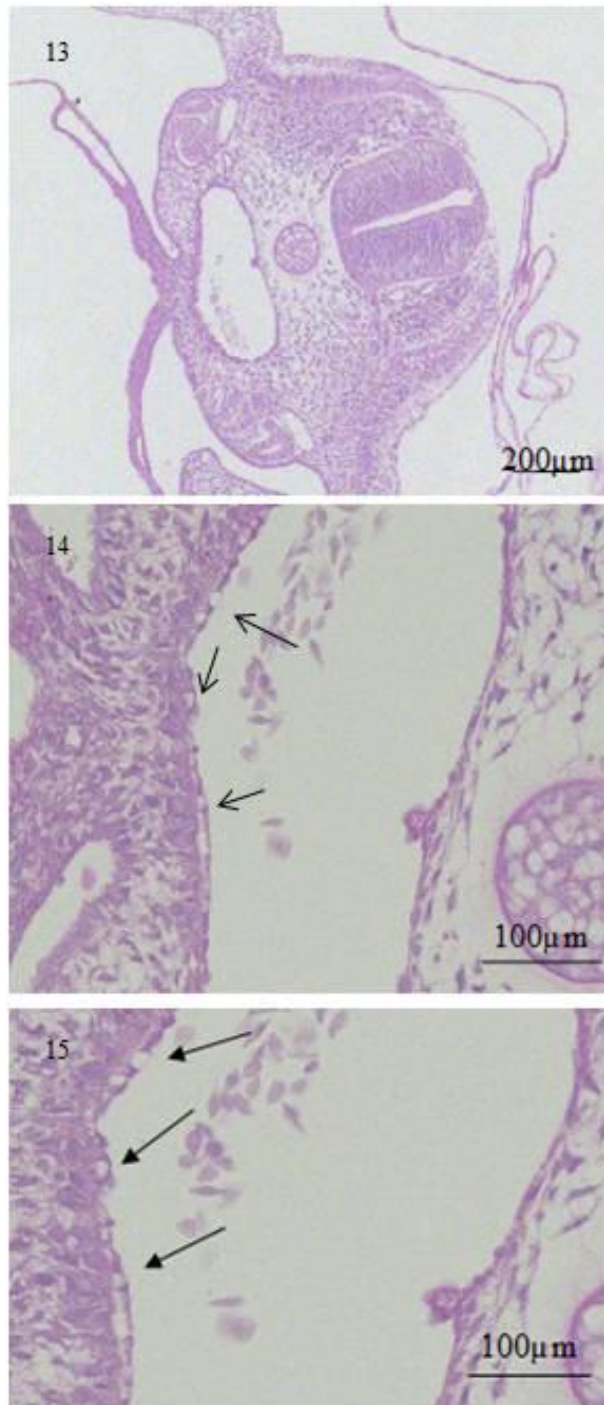


Figura 13: secção transversal de embrião E16-17, na altura da região AGM. PAS, 10X/0.25NA. Figura 14: detalhe do endotélio da aorta dorsal em embrião E16-17. Observam-se através das setas as inclusões endoteliais negativas. PAS, 40X/1.3NA. Figura 15: detalhe das inclusões endoteliais negativas mostradas pelas setas de cor preta no endotélio de embrião E16-17. PAS, 40X/1.3NA.

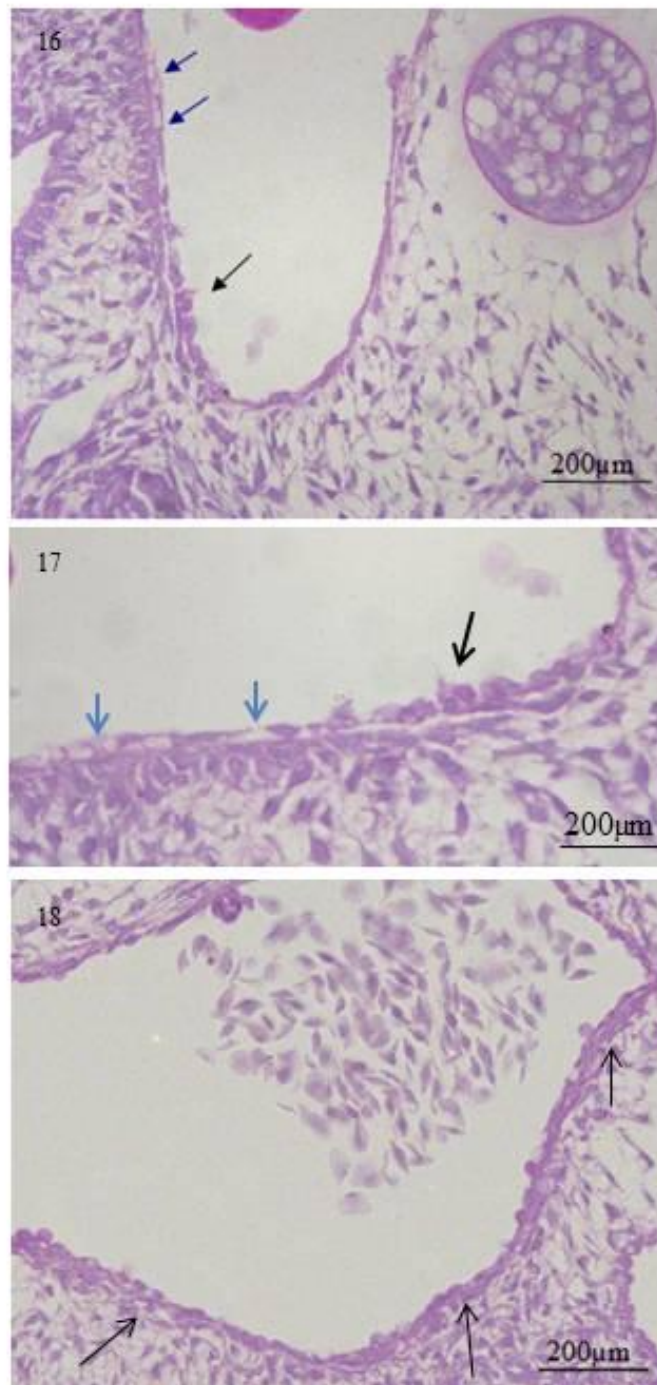


Figura 16: detalhe do endotélio do assoalho da aorta dorsal, em embrião E16-17. Seta de cor preta mostra mitose observada em alguns pontos do endotélio. Setas na cor azul mostram vacuolizações observadas no endotélio. PAS, 40X/1.3NA. Figura 17: detalhe das inclusões negativas em PAS e células em mitose do endotélio da aorta. 40X/1.3NA. Figura 18: detalhe do endotélio com hipertrofia em embrião E17. Observar a membrana basal bem delimitada (setas) pelo PAS. PAS, 40X/1.3NA.

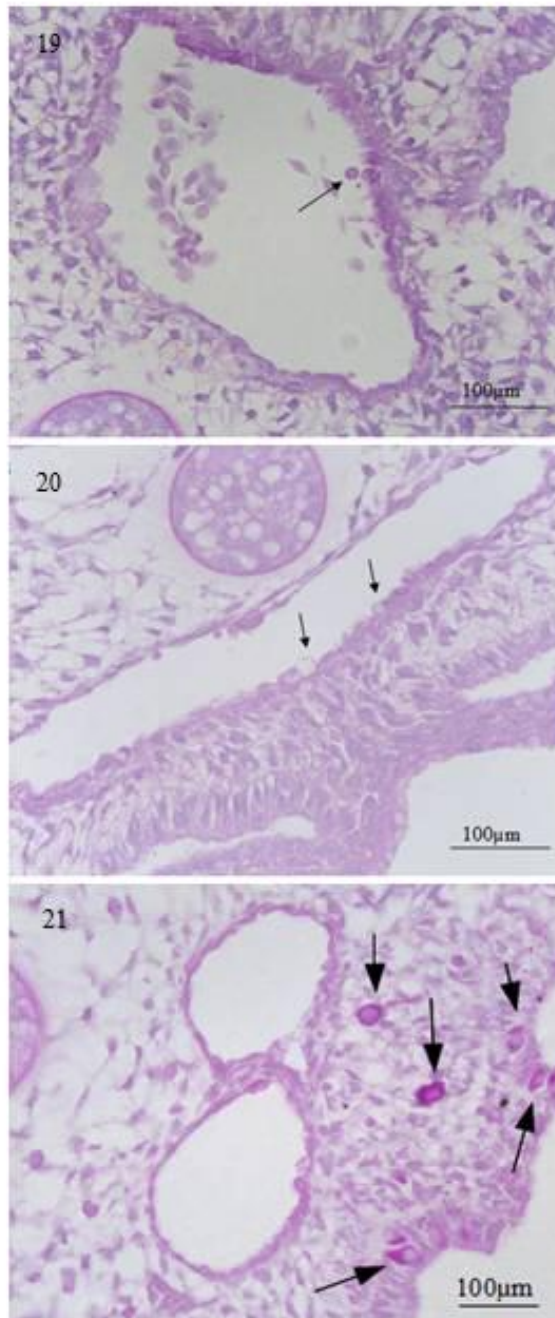


Figura 19 : detalhe do endotélio da aorta dorsal em embrião E18. Notam-se células PAS negativas se soltando do endotélio (seta preta). PAS, 40X/1.3NA. Figura 20: detalhe do assoalho do endotélio da aorta dorsal em embrião de E19, com inclusões negativas para PAS (setas pretas). PAS, 40X/1.3NA. Figura 21: células da crista neural positivas para PAS, em embrião E20. PAS, 40X/1.3NA.

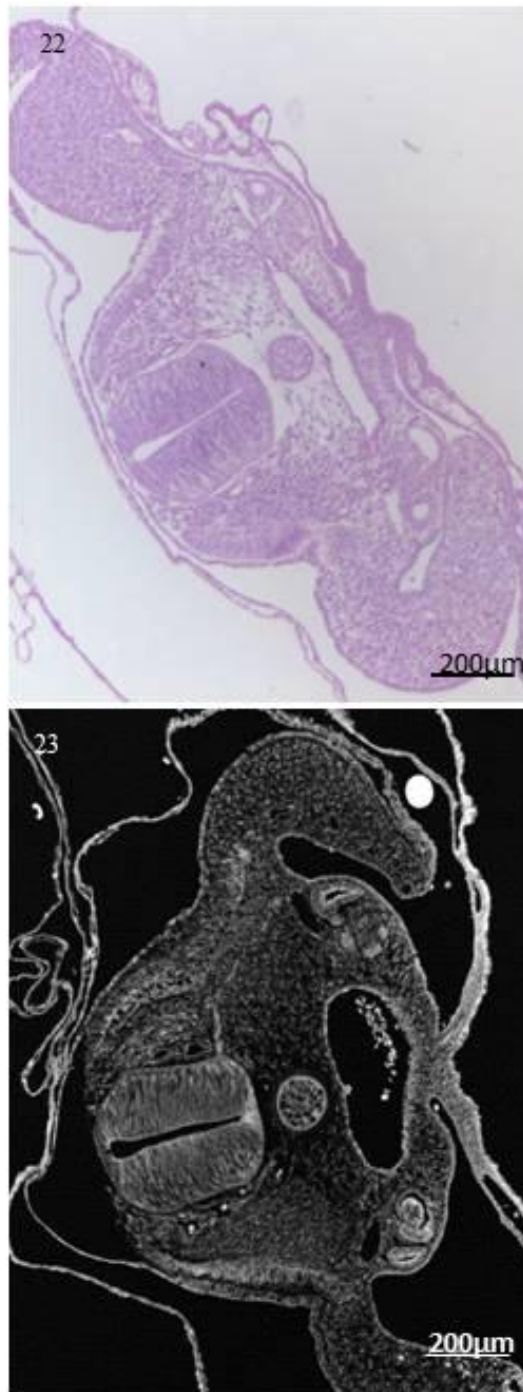
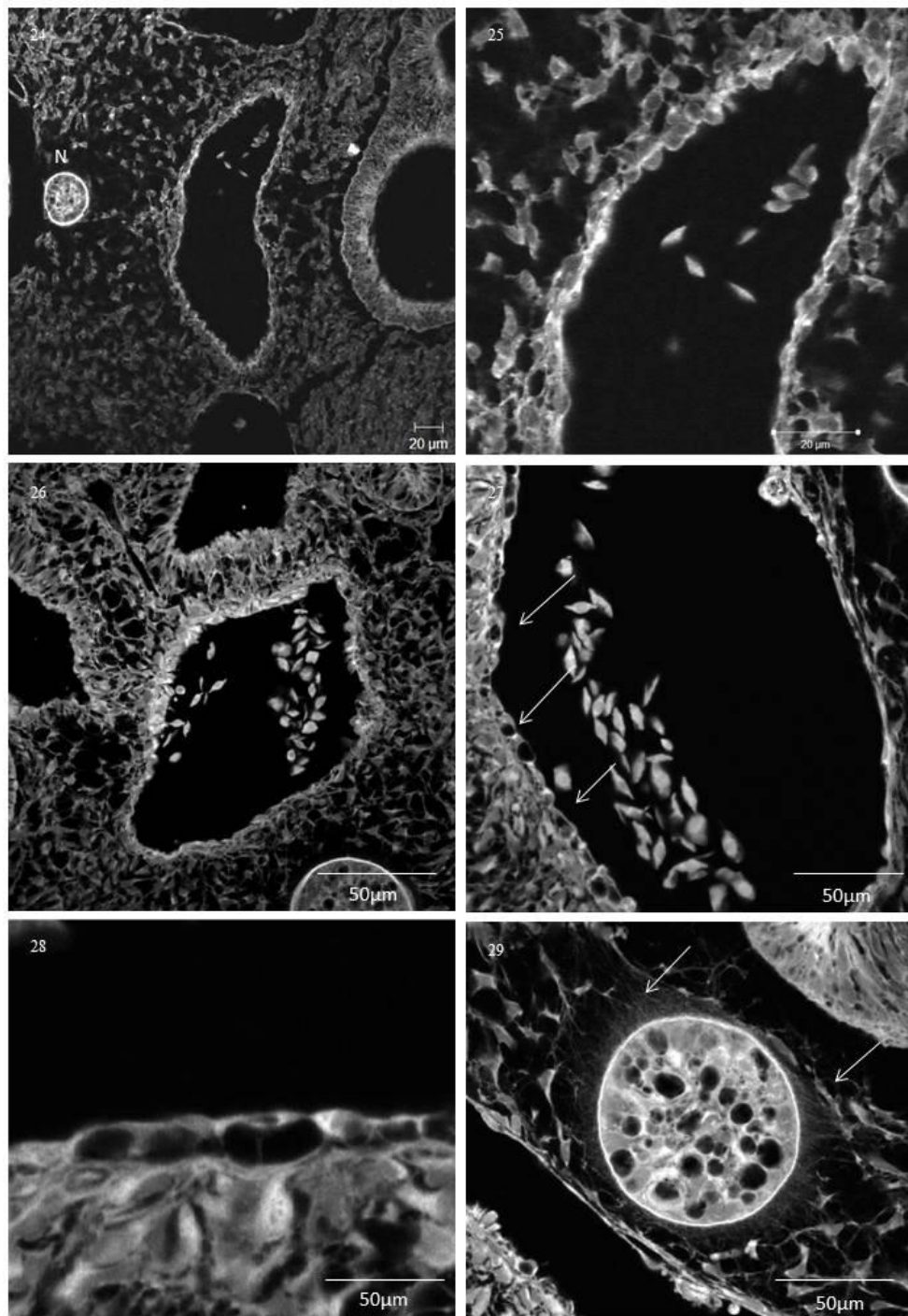


Figura 22: Visão panorâmica da região AGM. E16-17. PAS, 10X/0.25 NA. Figura 23: Mesmo campo, aquisição da imagem pelo microscópio confocal. E16-17. PAS, 10X/0.25 NA.



Figuras 24 e 25 : Membrana basal do endotélio positiva. Notar periferia da notocorda (N) também positiva. E 19+20. PAS 40X/1.3. Figura 26: subendotélio da aorta positivo. E19. PAS. 40X/1.3. Figura 27: aumento da inclusão negativa do endotélio da aorta. E16-17. PAS 40X/1.3. Figura 28: maior aumento da imagem anterior. E16-17. PAS 40X/1.3. Fig. 29: aumento da notocorda, notar matriz extracelular associada à notocorda positiva. E19. PAS 40X/1.3

4.3 Análise de secções parafinadas seriadas coradas por Alcian Blue (AB) pH 1.0 e contracoradas com Hematoxilina de Mayer, em microscópio de campo claro

Embriões de E16-17 mostraram forte marcação na periferia da notocorda (fig.31) contrastando com o interior com pouca expressão. Foi observada expressão em volta dos ductos mesonéfricos e no mesoderma lateral, além de marcação fibrilar tênue em volta do tubo neural (fig. 32). O mesênquima ao redor da notocorda também se mostrou corado e, em algumas regiões do embrião, o mesênquima mostrou coloração de aspecto granular (fig. 32).

Na aorta dorsal, a coloração pelo Alcian Blue foi observada em todo o seu endotélio, sendo mais intensa no assoalho (endotélio hipertrófico) do que no teto (endotélio pavimentoso). Além disso, foi verificada coloração de aspecto fibrilar do mesênquima circunjacente à aorta, mais densa na região associada ao assoalho.

As vacuolizações (fig. 32) e grupamentos celulares (fig.34) observados no endotélio da aorta também se mostraram negativas para Alcian-Blue pH 1.0. Nos demais estádios estudados o padrão topográfico de coloração foi semelhante, com aparente redução temporal da coloração do mesênquima até E20 (Fig. 30), e recuperação a partir de E21 (fig. 36). Em embrião de E19 foi possível também observar marcação subendotelial fraca entre o endocárdio e o mesoderma em diferenciação.

4.4 Análise de secções parafinadas seriadas coradas por Alcian Blue (AB) pH 2.5 e contracoradas com Hematoxilina de Mayer, em microscópio de campo claro

Em todos os estádios estudados, a distribuição topográfica de material AB pH 2.5 positivo foi muito semelhante àquela observada ao AB pH 1.0. No entanto, a intensidade de coloração foi sempre bem mais intensa para o primeiro (Figs. 31). Por exemplo, em E20, a coloração pelo Alcian Blue pH 2,5 apresentou-se bem mais intensa e difusa no mesênquima, quando comparada com aquela observada ao AB pH 1.0 (figs. 32 e 33). A periferia da notocorda apresentou-se bem corada, com aspecto heterogêneo. Houve marcação na periferia e entre as células do tubo neural e ao redor do mesoderma lateral.

O endotélio da aorta dorsal apresentou o mesmo padrão de expressão que nas secções observadas em AB pH 1.0, com intensificação do aspecto fibrilo-granular (Fig. 33) do mesênquima circunjacente. As inclusões do endotélio da aorta dorsal também se mostraram não coradas a esta técnica (Fig. 33).

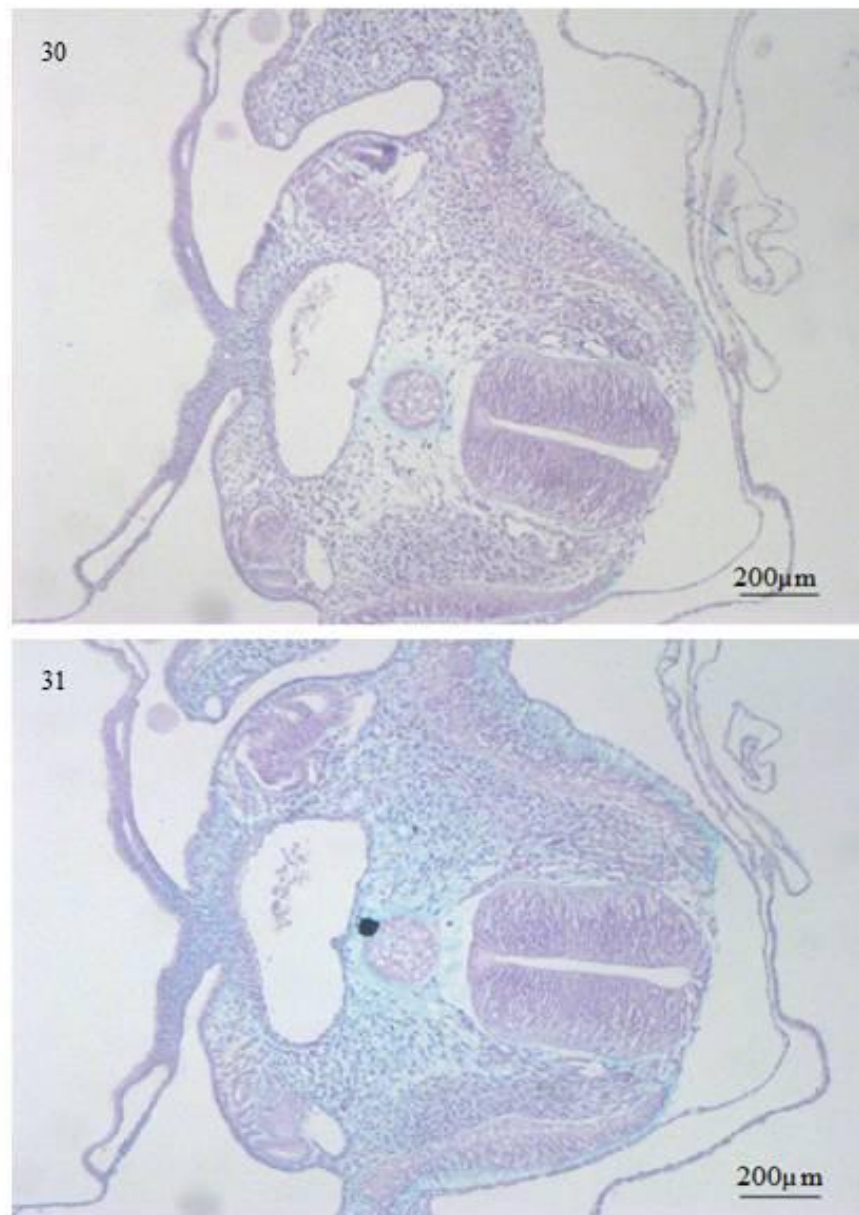


Figura 30: secção transversal de embrião E-20 na altura da região AGM. AB pH 1.0, 10X/ 0.25NA. Figura 31: secção transversal de embrião E20, na altura da região AGM. AB pH 2.5, 10X/0.25NA.

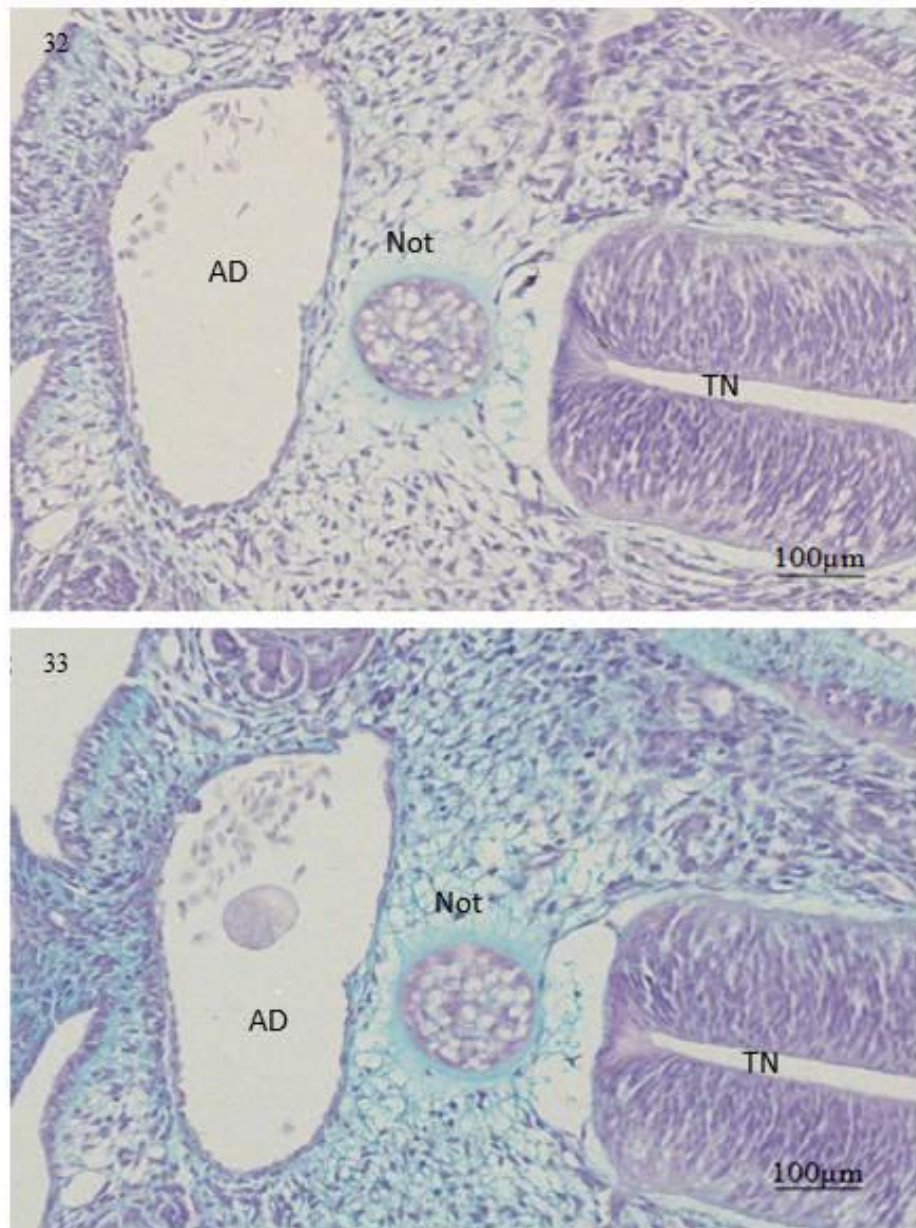


Figura 32: Detalhe do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E20. AB pH1.0. 20X/0.45NA. Figura 33: Detalhe do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E20. AB pH 2.5, 20X/ 0.45NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural.

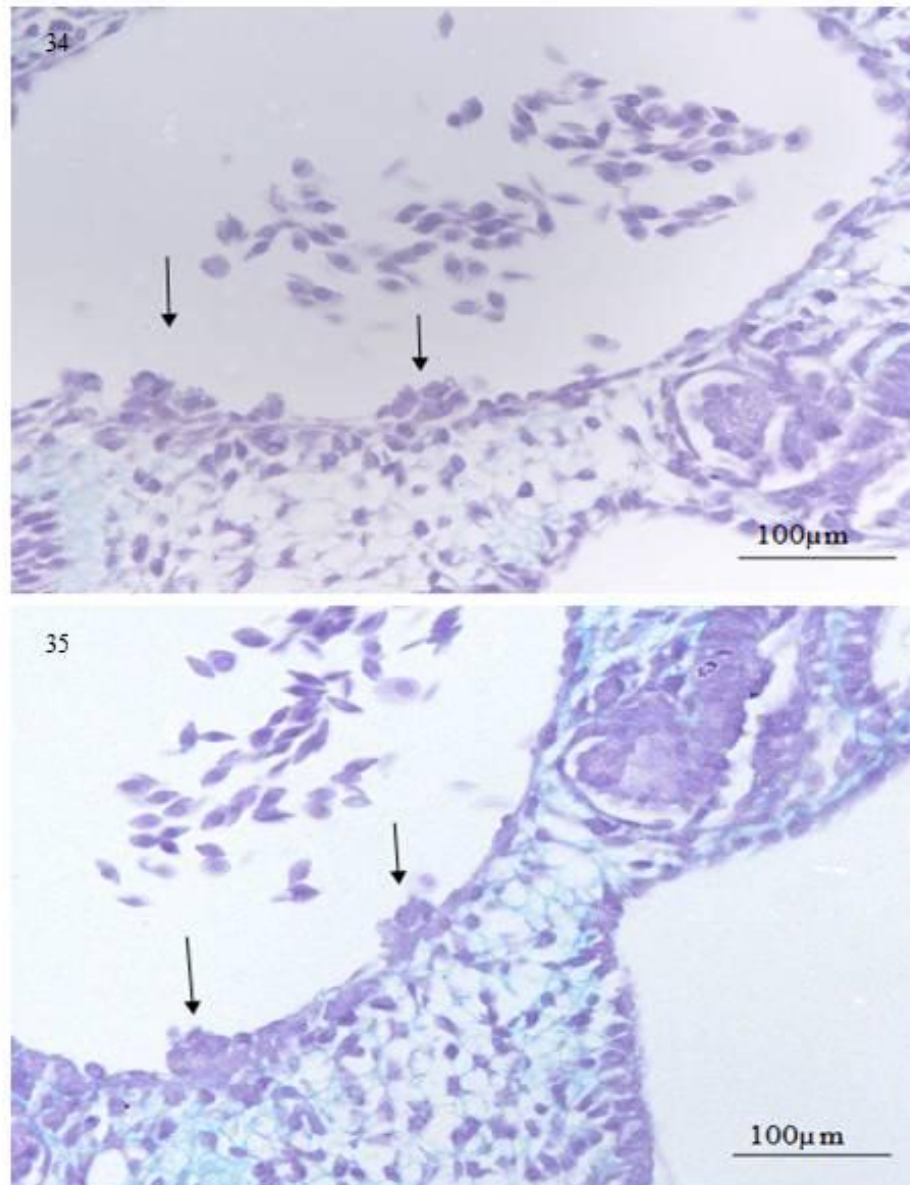


Figura 34: detalhe de grupamentos celulares no endotélio da aorta dorsal de embrião E19 (setas). AB pH1.0, 40X/1.3NA. Figura 35: detalhe de grupamentos celulares do endotélio da aorta dorsal e AB positivo no mesênquima abaixo da aorta dorsal, em embrião E19 (setas). AB pH 2.5, 40X/ 1.3NA.

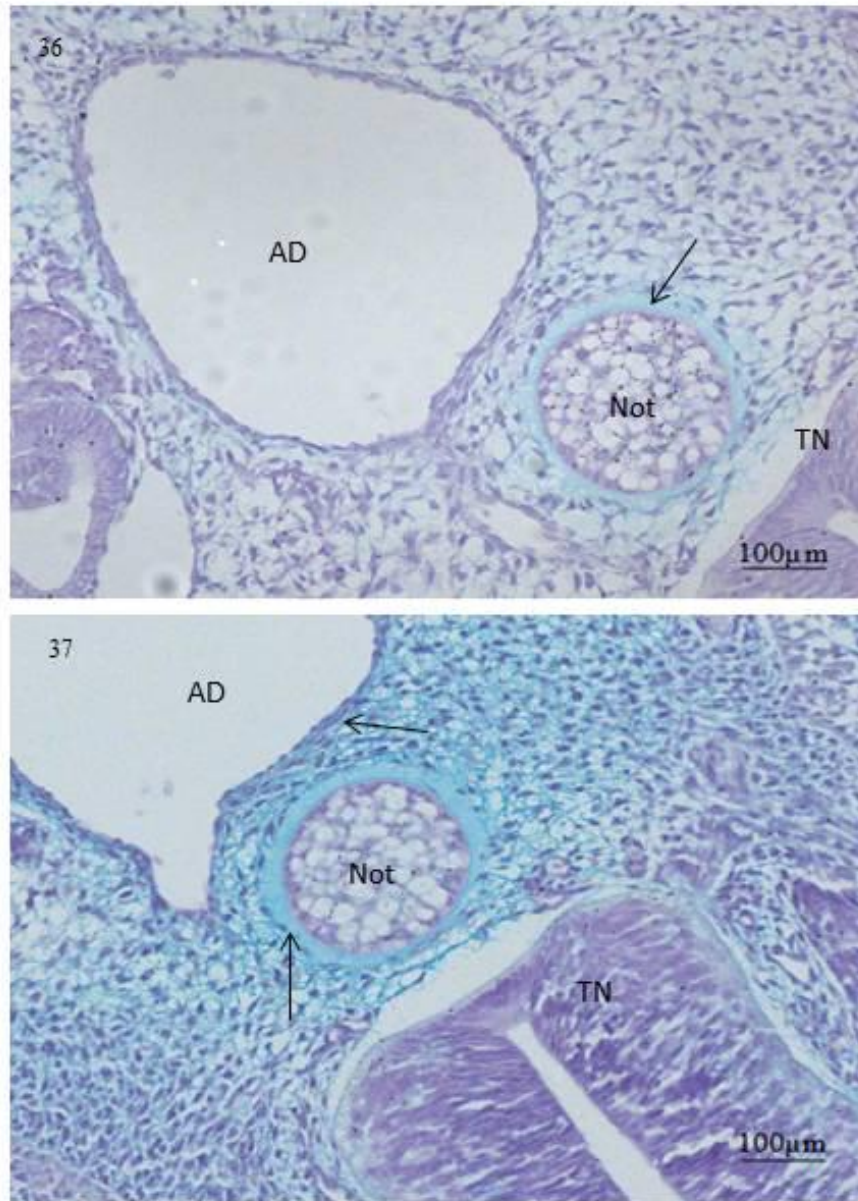


Figura 36: Parte do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E21. Percebe-se AB positivo na periferia da notocorda (seta). AB pH 1.0, 20X/0.45NA. Figura 37: Parte do tubo neural, notocorda e aorta dorsal de embrião E21. Percebe-se AB bem positivo na periferia da notocorda (seta), mesênquima e subendotelial da aorta dorsal (seta). AB pH 2.5, 20X/0.45NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural.

4.5 Análise das secções seriadas após marcação com lectinas fluoresceinadas

O padrão topográfico da marcação pelas lectinas fluoresceinadas, detalhado individualmente a seguir, encontra-se resumido na tabela 1.

Lectina *Abrus precatorius*: em embriões de E17, o mesênquima apresentou marcação intercelular difusa (Fig. 38). A notocorda apresentou positividade maior na periferia do que internamente (figs. 39 e 40). A região subendotelial da aorta dorsal mostrou marcação homogênea para esta lectina.

Em E20, foi constatada marcação forte na periferia da notocorda e fraca na região entre a notocorda e o mesênquima (fig. 40). No tubo neural, a superfície luminal das células e a periferia da estrutura apresentaram marcação (Figs. 40 e 41). O mesênquima mostrou marcação fibrilar intercelular, assim como os vasos do saco vitelínico. No tocante à aorta dorsal, foi observada marcação subendotelial, na membrana basal das células endoteliais (Fig. 39).

Em embriões de E 24-25, observou-se marcação na periferia da notocorda, contrastando com ausência desta na parte interna (Fig. 42). Na região entre o mesênquima e a notocorda, houve pouca conjugação desta lectina. No tubo neural, foi observada positividade na periferia e negatividade internamente. Não houve expressão na aorta dorsal.

Lectina *Arachis hypogaeae*: A fluorescência observada apresentou aspecto de “zíper” na superfície luminal e na periferia do tubo neural em embriões de E20 (figs. 43). O endoderma do saco vitelínico, assim como o celoma e o mesoderma lateral (figs. 44 e 45) do embrião apresentaram marcação. Em embriões de estágio E20-21, em relação à aorta dorsal não houve marcação por esta lectina (figs. 46 e 47).

Em embriões de E24-25, a notocorda também se apresentou negativa (Fig. 48). Foi observada marcação intercelular no tubo neural (Fig. 49). Nenhuma conjugação foi observada na aorta dorsal.

Lectina *Bandeiraea simplicifolia*: Embriões E20, E20-21 e E24-25 apresentaram marcação fibrilar difusa no mesênquima (fig. 50). Foi observada marcação intercelular no tubo neural em embriões de E20-21. A aorta dorsal apresentou-se fracamente marcada.

Lectina *Lens culinaris*: Em embriões de estádios E20-21, foi observada marcação na parte interna da notocorda e na sua periferia (Fig. 51), no mesênquima (difusamente), nos vasos do saco vitelínico e no mesoderma lateral. A aorta dorsal apresentou positividade na região subendotelial (Fig. 52).

Em embriões de estádios E 19+20, a periferia da notocorda apresentou positividade

(Fig. 52). Em relação à aorta dorsal no E19+20, a região subendotelial da aorta mostrou-se marcada, preferencialmente no assoalho. (fig.52).

Em embriões mais tardios, de E 24-25, o padrão de marcação desta lectina ficou restrito ao mesênquima do embrião.

Lectina *Ricinus communis*: em embriões de E17 foi observada marcação subendotelial fraca, compatível com a membrana basal do endotélio.

Em relação à notocorda, esta apresentou forte marcação, tanto interna quanto periférica (fig. 54 e 55). O tubo neural apresentou a periferia e as células da superfície luminal marcadas em E20 e E20-21 (figs. 55 e 57). O saco vitelínico também apresentou marcação para esta lectina, localizada em sua face mesodérmica. O intestino primitivo foi positivo, assim como o mesoderma do saco vitelínico. O endotélio da aorta dorsal apresentou marcação subendotelial em E20, principalmente no assoalho e lados do vaso. (Fig. 54).

Em embriões mais tardios, com estágio E24-25, foi encontrada uma marcação fraca na periferia da notocorda (Fig. 56). Não foi observada positividade em nenhuma outra região dos cortes de embriões neste estágio.

Foi também observado que as inclusões do endotélio mostraram-se negativas ao Azul de Evans, quando analisadas pelo microscópio confocal.

Lectina	Aorta dorsal	Tubo neural	Notocorda	Somitos	Mesênquima	Saco vitelínico
ABR	subendot./ membrana basal	periferia/ superfície luminal	periferia/ interna	-	+	endoderma
PNA	citoplasma das células endoteliais	periferia/ superfície luminal/ intercelular	-	-	-	endoderma
BSI	-	intercelular	-	+	difusa	+
LCA	teto/ subendot.	-	periferia/ interna	+	difusa	+
RCA	subendot./ membrana basal	periferia	periferia/ interna	+	-	mesoderma

Tabela 2 : Relação das lectinas estudadas e a sua localização de estruturas marcadas em secções de embriões de galinha com estádios de evolução entre E16 a E25. **ABR:** *Abrus precatorius*, **PNA:** *Arachis hypogaea*, **BSI:** *Bandeiraea simplicifolia*, **LCA:** *Lens culinaris*, **RCA:** *Ricinus communis*. **Subendot.:** subendotelial.

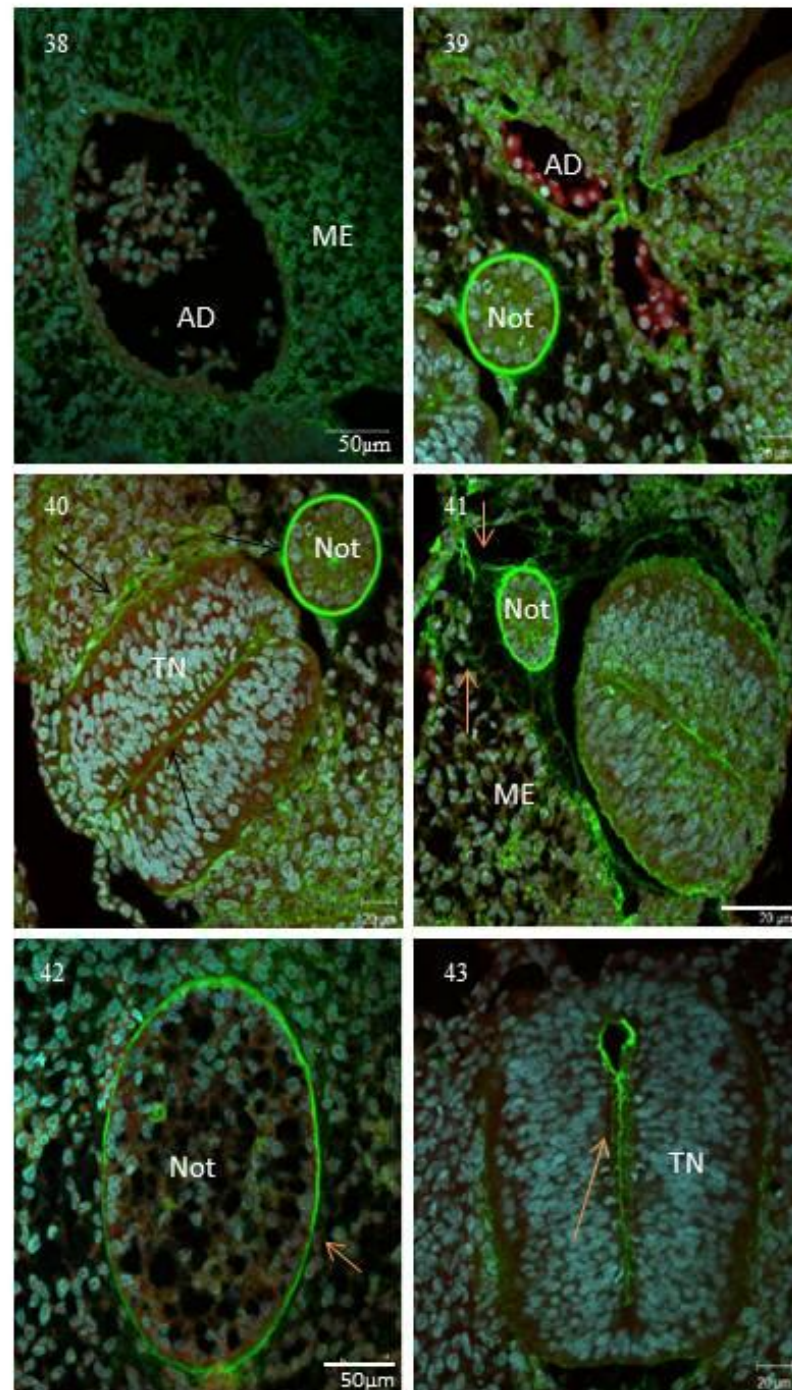
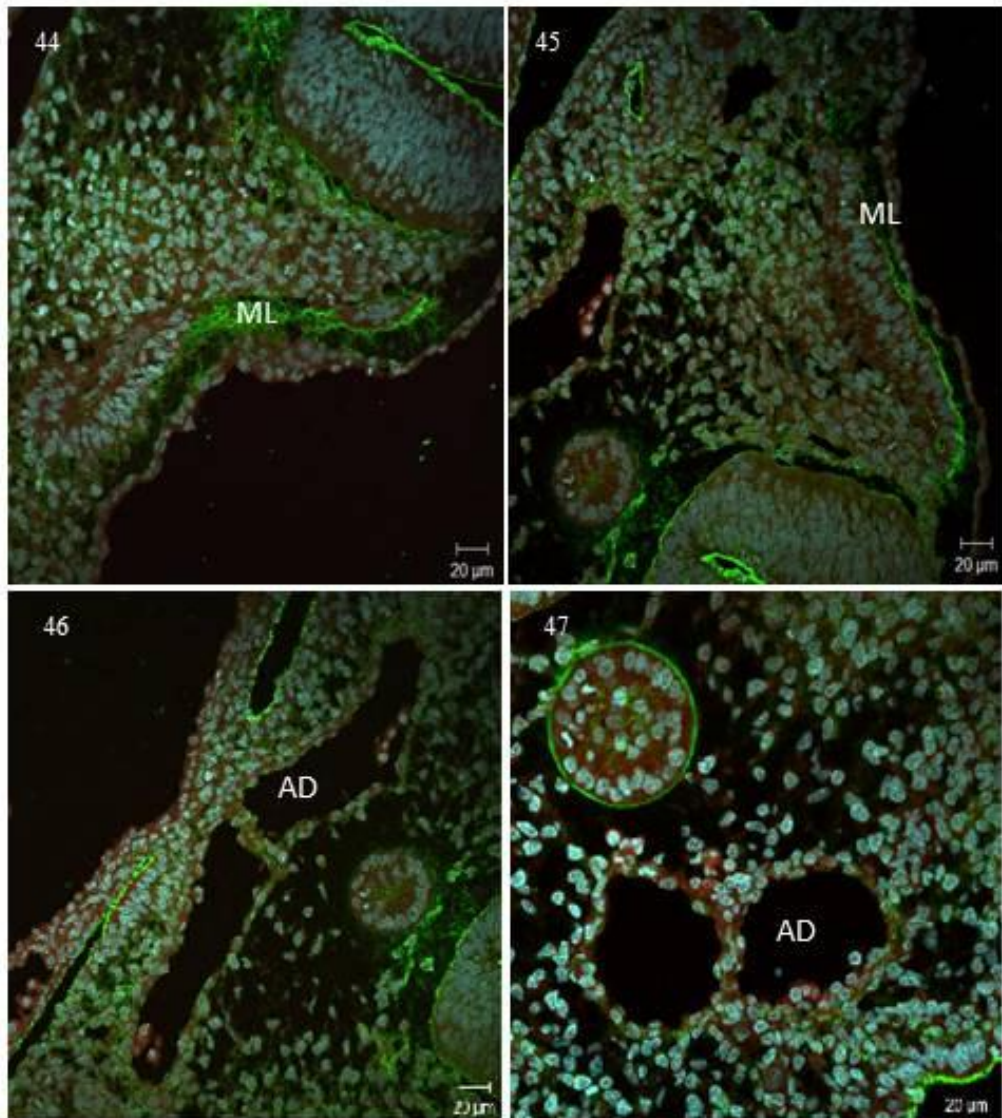


Figura 38: Mesênquima ABR. E17. 40X/1.3NA. Figura 39: Notar forte expressão de ABR na periferia da notocorda e expressão subendotelial na aorta dorsal. E20. 40X/1.3NA. Figura 40: Expressão de ABR na periferia e superfície luminal do tubo neural. E20. 40X/1.3NA. Figura 41: notar a expressão de ABR entre a notocorda e o mesênquima. E20. 40X/1.3NA. Figura 42: aumento da notocorda, mostrando menor expressão de ABR na sua periferia em embrião E24-25. 40X/1.3NA. Figura 43: expressão em forma de "zíper" na superfície luminal das células do tubo neural de PNA. E20. 40X/1.3NA. ME: mesênquima; AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural.



Figuras 44 e 45: mesodermas laterais positivos para PNA. E20. 40X/1.3NA.
Figuras 46 e 47: sem expressão de PNA na aorta dorsal de embriões E20.
40X/1.3NA. ML: mesoderma lateral; AD: aorta dorsal.

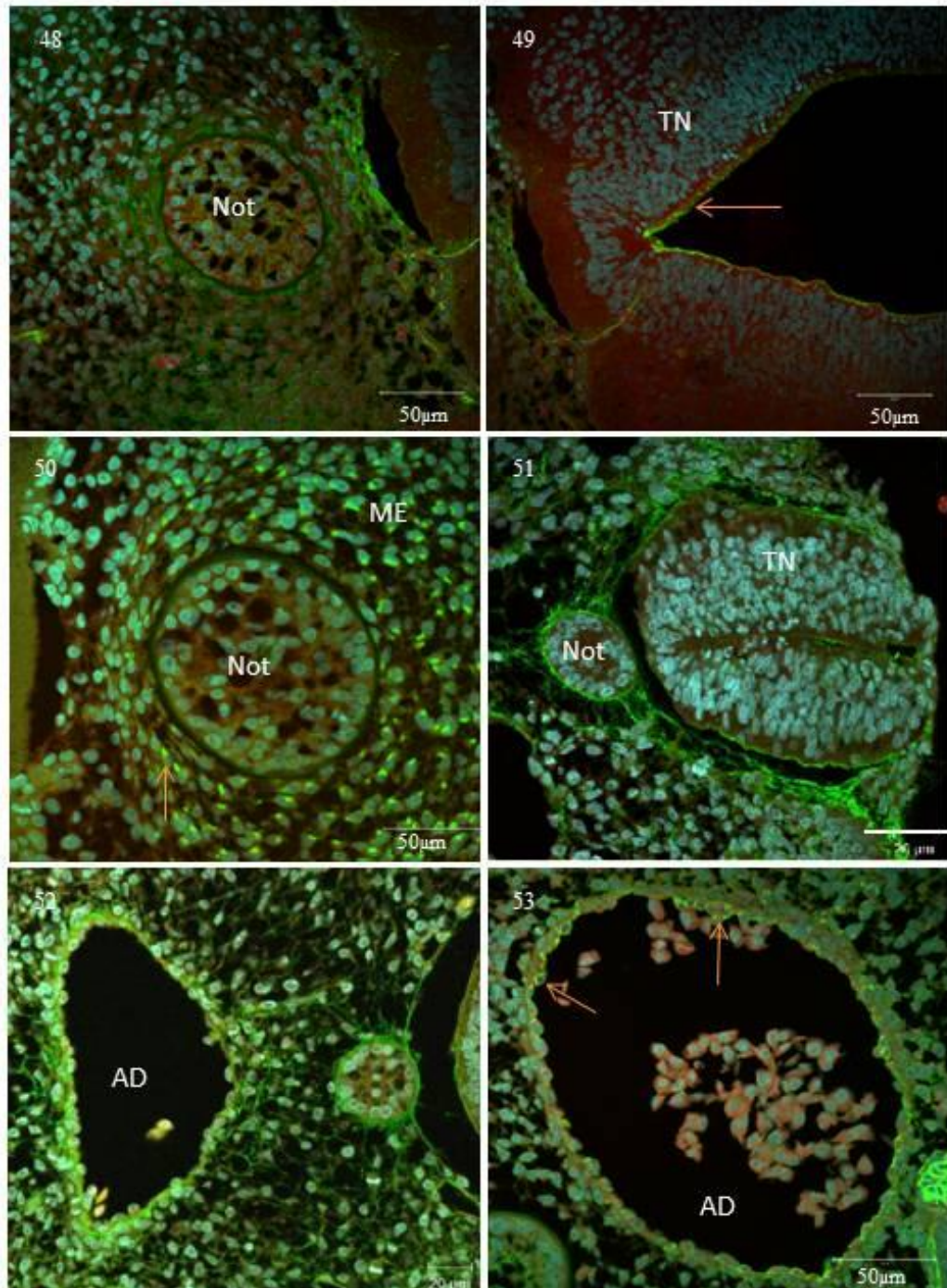


Figura 48: notocorda negativa para PNA. E24-25. 40X/1.3NA. Figura 49: superfície luminal das células do tubo neural positivas para PNA. E24-25. 40X/1.3NA. Figura 50: notocorda negativa, porém mesênquima positivo para BSI. Notar região perinuclear das células do mesênquima positivas (seta). E17. 40X/1.3NA. Figura 51: expressão de LCA na periferia da notocorda e tubo neural. E20-21. 40X/1.3NA. Figura 52: expressão subendotelial para LCA na aorta de E19+20. 40X/1.3NA. Figura 53: endotélio e grupamentos celulares da aorta dorsal positivos para PNA (setas). 40X/1.3NA. Not: notocorda; TN: tubo neural; ME: mesênquima; AD: aorta dorsal;

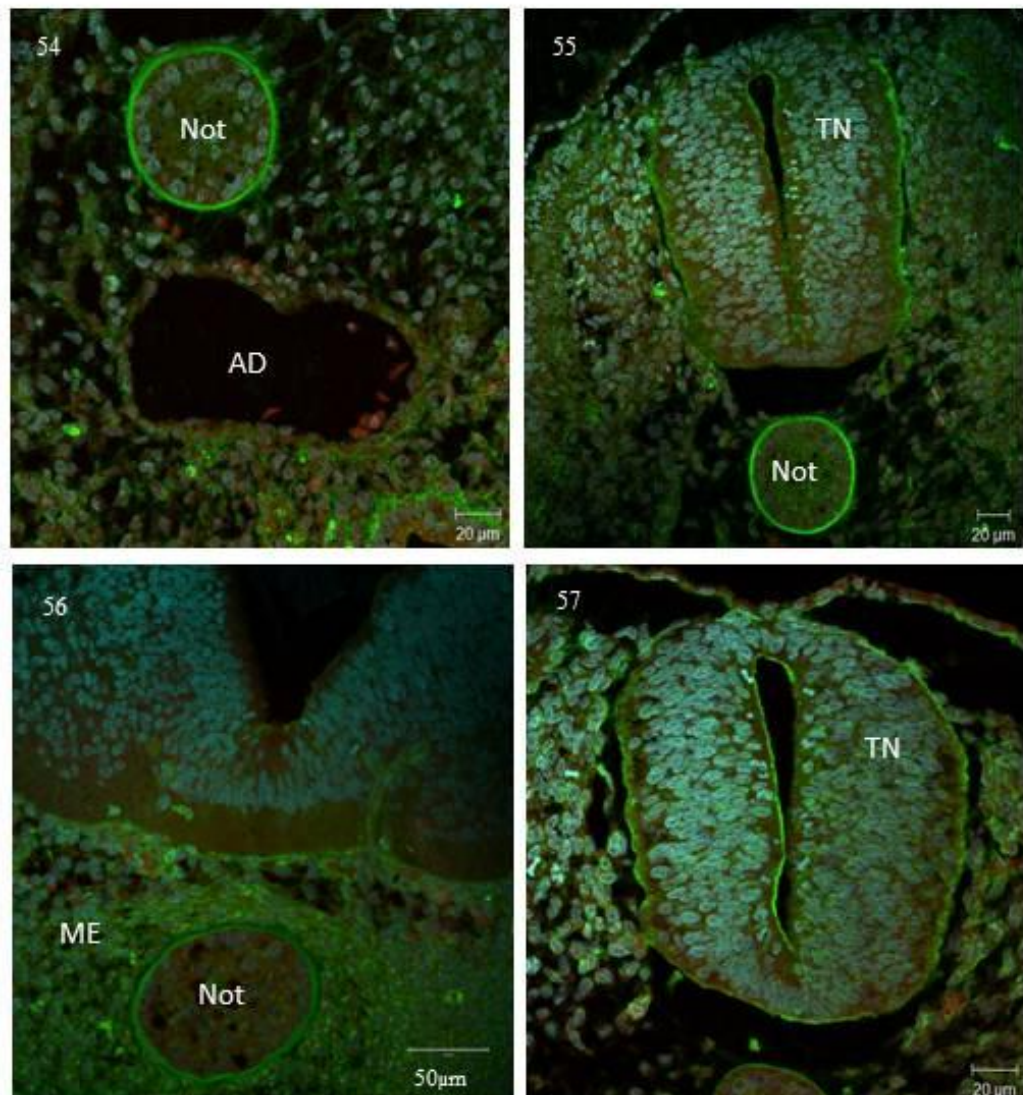


Figura 54: fraca expressão de RCA no subendotélio da aorta dorsal e na periferia da notocorda. E20. 40X/1.3NA. Figura 55: periferia e células da superfície luminal do tubo neural positivos para RCA; periferia da notocorda também positiva. E20. 40X/1.3NA. Figura 56: mesênquima positivo para RCA e periferia da notocorda. E24-25. 40X/1.3NA. Figura 57: periferia do tubo neural e células da superfície luminal positivas para RCA. E20-21. 40X/1.3NA. AD: aorta dorsal; Not: notocorda; TN: tubo neural; ME: mesênquima.

4.6 Análise de secções parafinadas submetidas à imunofluorescência, com anticorpos para fibronectina e analisadas por microscopia confocal de varredura a laser

Em E18, o mesoderma lateral, o intestino primitivo e o mesênquima apresentaram-se positivos para fibronectina (fig. 58), assim como a porção endodérmica das ilhotas de Wolff-Pander, no saco vitelínico (fig. 59). Na aorta dorsal em E16-17 (fig. 60) e E18 (fig. 61), houve expressão em células localizadas no entorno da aorta dorsal, justapostas ao vaso, principalmente no assoalho da aorta. Fibronectina também foi encontrada, com aspecto fibrilar, na matriz extracelular de todo o mesênquima de toda a região AGM.

Em E16, a matriz que recobria o tubo neural e a notocorda apresentou-se positiva para fibronectina, assim como os somitos (fig. 62). Foi observada também a presença de grupamentos de células se destacando da aorta, os quais apresentaram fibronectina entre elas, em E16-17 (fig. 63).

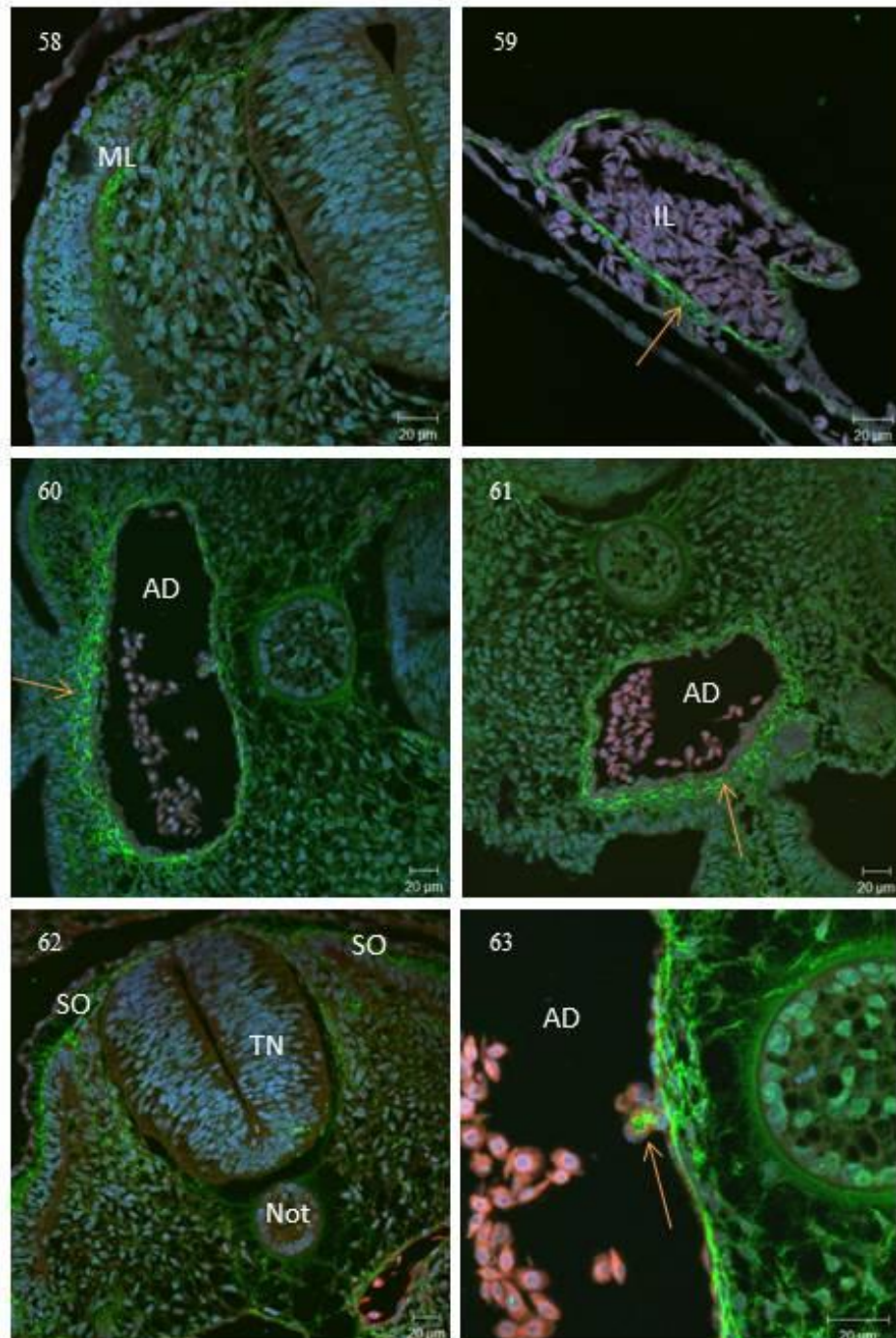


Figura 58: fibronectina positiva no mesoderma lateral. E18. Figura 59: endoderma (seta) das ilhotas de Wolff-Pander do saco vitelínico positivas para fibronectina. E18. Figura 60: expressão de fibronectina na região subendotelial da aorta dorsal, principalmente no assoalho da aorta (seta). E16-17. Figura 61: mesmo padrão de expressão da fibronectina (seta), em E18. Figura 62: expressão de fibronectina na matriz que circunda a notocorda, o tubo neural e nos somitos. E16. Figura 63: aumento do assoalho da aorta, com visível grupamento de células se destacando do endotélio, positivo para fibronectina. E16-17. Todas as imagens foram adquiridas com objetiva de 40X/1.3NA. ML: mesoderma lateral; IL: ilhota do saco vitelínico; AD: aorta dorsal; SO: somitos TN: tubo neural; Not: notocorda.

4.7 Análise de secções parafinadas de embriões submetidos à imunofluorescência, com anticorpos contra moléculas do citoesqueleto e analisados por microscopia confocal de varredura a laser

Em embrião E16-17, a desmina apresentou marcação em células do mesênquima, do tubo neural, e nos somitos (fig. 64). Em embriões E18, houve expressão em células do coração e do mesênquima. Não houve expressão em nenhuma célula da aorta dorsal em nenhum dos dois pontos de análise (fig. 65).

Em embrião E16-17, a alfa-actina de músculo liso apresentou-se positiva no saco vitelínico e nos somitos. Em embriões E16-17 também observou-se marcação em ilhotas do saco vitelínico (fig.66), mesoderma lateral e em células musculares do coração do embrião, revelando estriações. Na aorta dorsal houve expressão em células justapostas ao vaso, principalmente na região do assoalho da aorta (fig. 67).

Em embrião E16-17 e E19-20, a proteína fibrilar ácida glial (GFAP) apresentou as células internas do tubo neural (fig. 68) positivas, assim como as células da superfície luminal (fig.69). A aorta dorsal apresentou-se negativa em todos os seus componentes.

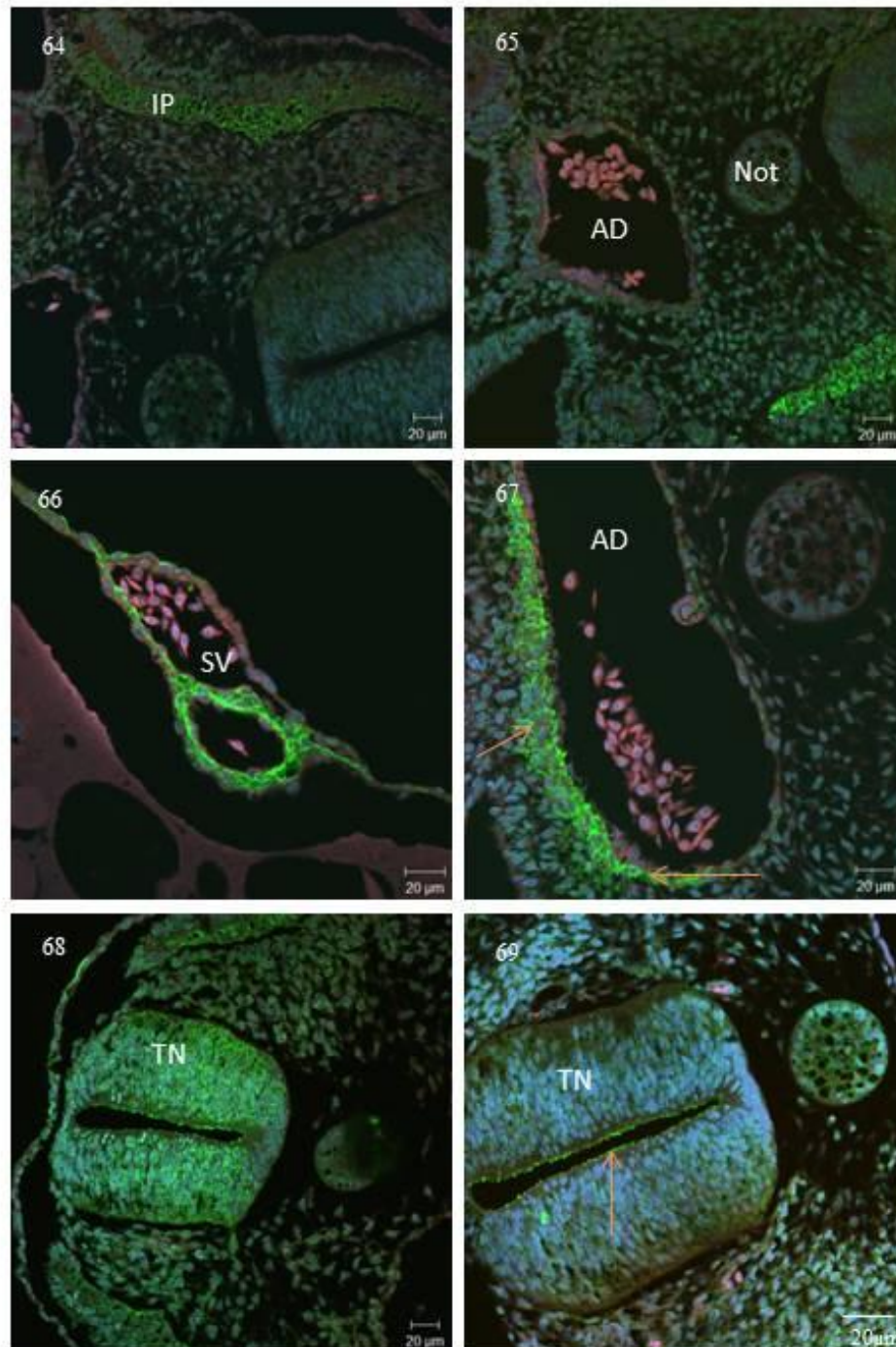


Figura 64: intestino primitivo positivo para desmina . E16-17. Figura 65: negativo para desmina na aorta dorsal e na notocorda. E18. Figura 66: expressão de α -actina de músculo liso no saco vitelínico. E16-17. Figura 67: expressão subendotelial de α -actina de músculo liso no assoalho da aorta (seta) e nos lados (seta). E16-17. Figura 68: células internas do tubo neural positivas para GFAP. E20-21. Figura 69: células da superfície luminal (seta) do tubo neural positivas para GFAP. E16-17. Todas as imagens foram adquiridas com objetiva de 40X/ 1.3NA. IP: intestino primitivo; AD: aorta dorsal; Not: notocorda; SV: saco vitelínico; TN: tubo neural.

4.8 Análise de secções parafinadas de embriões que passaram por imunofluorescência, com anticorpos para superfície celular e analisados por microscopia confocal de varredura a laser

Em embriões E20-21, observou-se expressão de BMP-4 na notocorda, na superfície luminal e entre as células do tubo neural (fig.70). Também houve expressão no mesoderma do saco vitelínico de embrião deste estágio (fig. 71). Em relação à aorta dorsal, em E16-17 houve ausência de expressão desta molécula (fig. 72). Em embrião E20-21 por todo o mesênquima que circunda o vaso e a notocorda (fig. 73).

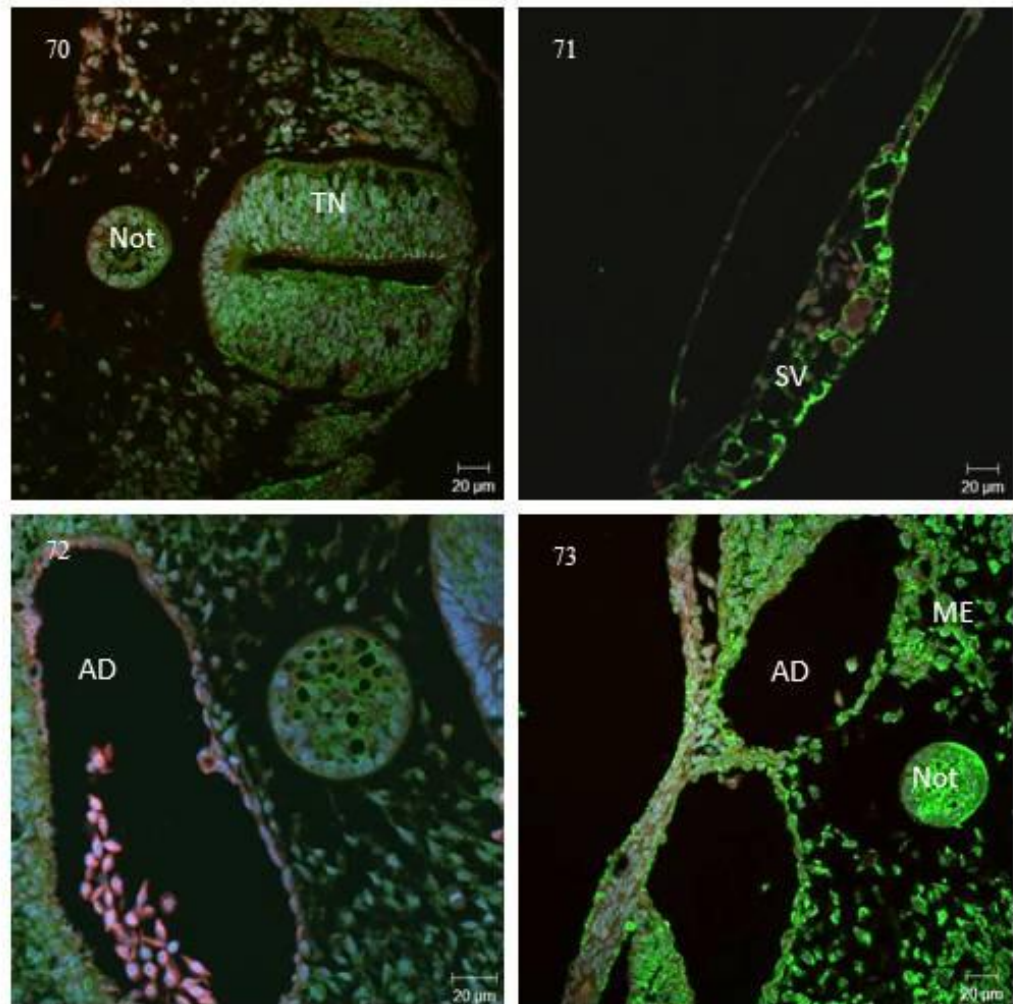


Figura 70: expressão de BMP-4 na notocorda, entre as células e na superfície luminal do tubo neural. E20-21. Figura 71: BMP-4 positivo no saco vitelínico. E20-21. Figura 72: fraca expressão de BMP-4 no subendotélio do assoalho da aorta dorsal. E16-17. Figura 73: expressão de BMP-4 no interior e periferia da notocorda. Expressão da molécula no endotélio e subendotélio da aorta, em todas as suas regiões. Mesênquima também positivo. E20-21. Todas as imagens foram adquiridas com objetiva de 40X/1.3NA. Not: notocorda; TN: tubo neural; SV: saco vitelínico; AD: aorta dorsal; ME: mesênquima.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos alguns aspectos histológicos do desenvolvimento de embriões de *Gallus gallus domesticus* L., no período embrionário compreendido entre E16 e E25, com foco principal na região AGM e, dentro desta, no endotélio da aorta dorsal.

O estadiamento dos embriões foi realizado através de transiluminação do ovo, isto porque embriões mantidos em chocadeira por um mesmo período de tempo, com umidade e temperatura controladas, apresentaram estádios de desenvolvimento diferentes. Nesse sentido, alguns indivíduos desenvolveram-se mais rapidamente que outros e o estadiamento correto apenas foi possível através do método de Hamburger & Hamilton (1951). Embora a passagem de um estágio para outro no início do desenvolvimento seja bastante acelerada, com importantes modificações evolutivas, foram percebidas poucas diferenças nos elementos morfológicos e bioquímicos abordados neste trabalho entre embriões de estádios diferentes dentro do período de desenvolvimento estudado.

A região ventral da aorta dorsal é reconhecida como o local onde células-tronco hematopoiéticas são produzidas durante o desenvolvimento de várias espécies, como em anfíbios, aves e mamíferos (Chen and Turpen, 1995; Dieterlen-Lièvre, 1975; Cormier et al., 1986; Cumano et al., 1996; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Tavian et al., 1996; Dieterlen-Lièvre et al., 2000). Estes estudos mostram que este programa genético é altamente conservado entre as espécies (Jaffredo et al., 2010). A origem destas células-tronco hematopoiéticas não é totalmente definida. Duas populações de células hematopoiéticas foram encontradas: (1) grupamentos celulares intimamente associados à aorta, no período E3-E4 de desenvolvimento, que migrariam para a luz da aorta (Dantschakoff, 1909; Sabin, 1917; Dieterlen-Lièvre et al., 1977, 1981; Jaffredo *et al.*, 1998); (2) grupamentos celulares para-aórticos que seriam a sede da hematopoiese difusa, somente no lado ventral da aorta dorsal de origem mesentérica, nos dias E6-E9 de desenvolvimento (Miller, 1913; Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981). Ainda não há consenso se estas duas populações celulares surgem do mesmo progenitor ou de diferentes progenitores.

Com o intuito de observar a histofisiologia da região AGM de embriões de galinha, um dos modelos clássicos de biologia do desenvolvimento da hematopoese, foram realizados cortes histológicos seriados transversais, os quais permitiriam não somente uma análise integrada com o desenvolvimento global do embrião, mas principalmente garantiriam que eventos pequenos e pontuais pudessem ser detectados. Um desses eventos seria a própria transição endotélio-hematopoese (“EHT”) do chamado endotélio hemogênico, pois os

grupamentos celulares que se formam a partir do endotélio da aorta costumam ter pequena quantidade de células (Gordon-Keylock e Medvinsky, 2011).

Neste estudo, um dos aspectos mais interessantes encontrados em relação à aorta dorsal foi o encontro de hipertrofia da face ventral do vaso, concomitante ou não com vacuolização das células endoteliais, encontradas em estádios diferentes do intervalo de desenvolvimento estudado e que se posicionavam na região basal da célula, deslocando o núcleo para o ápice. A topografia destas vacuolizações não foi homogênea ao longo do endotélio aórtico, sendo mais intensa no assoalho, onde a hipertrofia era verificada, e nos lados da aorta dorsal, onde apresentava limite bem definido com células endoteliais mais planas, morfologia esta verificada no teto aórtico. Estes dados são consonantes com a diferença de origem embriológica de cada região do vaso, isto é, enquanto o teto e os lados da aorta dorsal são de origem dos somitos, o assoalho é originado do mesoderma da esplancopleura (Pardanaud et al., 1996; Pardanaud and Dieterlen-Lièvre, 1999).

Os trabalhos publicados sobre a emergência da hematopoese a partir do endotélio, tanto em aves quanto em camundongos, não fazem menção ao encontro de vacuolizações semelhantes às observadas nesse estudo, embora alguns relatem o encontro de hipertrofia celular (Tavian et al, 1996). Por exemplo, Pelajo-Machado (2001) observou, em embriões de camundongos Swiss Webster que, por volta de 10 dias pós-coito, grupamentos celulares aderidos ao endotélio eram frequentes, em especial no assoalho aórtico. No entanto, este autor não observou nenhuma vacuolização do endotélio aórtico, mesmo tendo trabalhado também com secções seriadas de embriões inteiros em vários estádios de desenvolvimento. Em aves, embora não haja estudos publicados com análise histológica da região AGM através de cortes seriados, as imagens de cortes transversais desta região que ilustram estes trabalhos em nenhum momento mostram este aspecto (Bolletrot et al, 2005, Swiers et al, 2005, Tavian et al, 1996). Consideramos que isto possa ser devido ao emprego da microscopia com pequenas magnificações e/ou ao tipo de coloração/ marcação que estes trabalhos empregaram, que poderia dificultar a visualização destas inclusões.

Na literatura, não há relatos específicos sobre o conteúdo bioquímico citoplasmático das células endoteliais da aorta dorsal. De fato, considerando o interesse central da literatura sobre a emergência da hematopoese, os artigos costumam adotar estratégias metodológicas voltadas para a marcação das células progenitoras, acompanhando posteriormente sua migração e diferenciação (Bollerot et al, 2005; Huang e Auerbach, 1993; Spangrude e Brooks, 1993; Spangrude et al, 1988), ou então utilizar o reconhecimento de moléculas de superfície que possam ser indicativos de modificação do fenótipo destas células, como é o caso do

CD45, CD31, CD34, entre outros (Tavian et al, 1996; Bollerot et al, 2005).

A partir da observação destas vacuolizações do endotélio, bem como da carência de dados sobre a composição molecular do citoplasma destas células, nos perguntamos qual seria a natureza bioquímica de seu conteúdo e o seu papel durante o desenvolvimento do embrião. Através de secções de embriões submetidos à reação histoquímica de PAS, foi observado que as células do endotélio são PAS positivas, apoiadas sobre uma membrana basal também PAS positiva. Como o pré-tratamento com diástase não modificou o padrão de reação ao PAS, o conteúdo citoplasmático destas células não seria, ao menos significativamente, glicogênio. Observando-se estas células, percebemos que existe uma diminuição da hipertrofia observada no endotélio da aorta e estas células quando se destacam da membrana basal e se deslocam para a luz do vaso, aumentam a reatividade ao PAS. Nesse sentido, as células circulantes com citoplasma fortemente PAS positivo que foram ocasionalmente encontradas na luz da aorta e de outros vasos que possivelmente correspondem a estas que descolam do endotélio ao mesmo tempo em que aumentam seu conteúdo citoplasmático de glicoproteínas, as quais não possuem morfologia compatível com as linhagens eritróide e macrofágica primitivas, oriundas do saco vitelínico. Embora a reação de PAS não possibilite definir exatamente quais moléculas estariam presentes nessas células, levantamos a possibilidade de, ao menos em parte, esta positividade ser relativa à expressão de CD34. Este marcador, que é uma sialomucina (motivo pelo qual seria positivo ao PAS), é um dos empregados em vários trabalhos para determinar a mudança das células da aorta dorsal de um fenótipo endotelial (CD31+, CD34-, CD45-), para um fenótipo hematopoético (CD31-, CD34+, CD45+) (Tavian et al, 1996; Bollerot et al, 2005). Analogamente, o CD34 é considerado um dos melhores marcadores para células hematopoéticas imaturas de mamíferos adultos, sendo inclusive utilizado no isolamento e seleção de células para transplantes de medula óssea (Wood et al, 1997). Além disso, as mucinas e sialomucinas vêm sendo implicadas diretamente na relação das células-tronco hematopoéticas adultas e o estroma da medula óssea, tendo papéis importantes no balanço entre a manutenção da quiescência quanto na diferenciação destas células, de modo que talvez haja alguma importância destas também na relação das primeiras células hematopoéticas originadas na aorta dorsal com o vaso em si.

As mesmas secções submetidas à reação de PAS apresentaram fluorescência no microscópio confocal. Embora haja relatos esporádicos da propriedade fluorescente do produto final desta reação (Pawley, 2006), não foram encontradas publicações que sistematizem um protocolo que forneça resultados constantes, nem quais seriam as curvas espectrais de excitação e emissão esperadas. Por este motivo e tendo observado resultados

constantes em todas as lâminas com o protocolo que empregamos, caracterizamos estas curvas, através do detector META do microscópio confocal e as adotamos para gerar imagens, as quais proporcionaram maior resolução e contraste que a microscopia de campo claro e, por decorrência, melhor detalhamento de estruturas com baixa positividade à reação de PAS. Mesmo assim, o padrão de estruturas fluorescentes do embrião no microscópio confocal foi o mesmo observado nas secções no microscópio de campo claro. Confirmando os achados à microscopia de campo claro, observamos fluorescência na membrana basal da aorta bem como nas células que se destacavam do endotélio, e as vacuolizações se confirmaram negativas.

Outras estruturas da região AGM também se mostraram fortemente positivas ao PAS (campo claro e confocal) nos estádios estudados. A periferia da notocorda, por exemplo, sempre se mostrou fortemente marcada, assim como a periferia e o interior do tubo neural, mesonefros, intestino primitivo, mesênquima e saco vitelínico.

Na tentativa de elucidar quais tipos de glicosaminoglicanos estariam presentes nesta região AGM do embrião, além da histoquímica com a reação de PAS, coramos as secções com Alcian Blue em pH 1,0 e pH 2,5, contraindicando com Hematoxilina para manter o referencial da organização celular através da coloração de seus núcleos. Em pH 1.0 são corados preferencialmente os mucopolissacarídeos sulfatados, enquanto que, em pH 2.5 os mucopolissacarídeos ácidos. A tabela (3) a seguir mostra os tipos de carboidratos marcados através da reação de PAS e de colorações AB 1.0 e AB 2.5, de acordo com Culling (1974).

	PAS	Alcian-Blue pH 1.0	Alcian-Blue pH 2.5
Glicogênios	+	-	-
Ácido Hialurônico	-	-	+
Sulfato de condroitina A e C	-	+	+
Sulfato de condroitina B	-	+	+
Heparina	-	+	+
Queratosulfato	-	+	+
Mucinas	+	-	-
Sialomucinas	+ *	-	+
Sialomucinas sufatadas	+	+	+ *
Cerebrosídeos	+	-	+
Lipídeos insaturados	+	-	-
Grupos aldeídos	+	-	-

Tabela 3: relação dos carboidratos mostrados através das técnicas de PAS, AB pH 1.0 e pH 2.5. * ocasionalmente apresentam-se positivos.

Na região AGM, a coloração pelo Alcian Blue pH 2,5 foi mais difusa e intensa que aquela pelo Alcian Blue pH 1,0 em todos os estádios avaliados, denotando uma provável predominância de ácido hialurônico, além da presença de sialomucinas (cuja importância já foi comentada) e cerebrosídeos.

Percebemos que as vacuolizações do endotélio também são Alcian Blue negativas em ambos os pH empregados, de modo que o conteúdo destas inclusões também não seria do grupo das glicosaminoglicanas. Conjecturamos então que talvez o conteúdo das vacuolizações seria lipoproteico e que o xilol o teria removido durante o processamento histológico. Um resultado que reforça esta hipótese é a negatividade destas vacuolizações também ao Azul de Evans, reagente habitualmente utilizado como contracoloração nas técnicas de fluorescência por corar proteínas indiscriminadamente e que também não foi capaz de corar estas estruturas. Dentro dessa hipótese, se faz necessário complementar esta abordagem futuramente com o

emprego de secções congeladas de embriões, obtidas em criostato, mesmo se tratando de procedimento com certa dificuldade técnica, tanto por conta da dificuldade de posicionamento correto do embrião no bloco de OCT, quanto pela precisão na obtenção do corte na topografia correta da aorta.

De acordo com os resultados observados quanto à presença de carboidratos no embrião, decidimos estudar o perfil de resíduos de açúcares principalmente no endotélio da aorta dorsal. Com este objetivo, utilizamos lectinas fluoresceinadas.

O uso das lectinas ligadas à fluorocromos ou ligadas à peroxidase tem sido utilizadas para detectar mudanças fenotípicas celulares e mudanças da matriz extracelular, associadas à diferenciação do tecido e morfogênese de órgãos (Hinchliffe et al, 1988). Mudanças em relação à lâmina basal e sua ligação à lectinas também foram observadas durante o curso da morfogênese de órgãos com interações epitélio-mesenquimais, tais como o pulmão (Gallagher, 1986), dentes (Blotner e Linder, 1987) ou rins (Laitinen et al, 1987). Hinchliffe em seu artigo estudou o padrão de expressão de glicoconjugados durante a diferenciação do broto da pata de embriões de galinha, em estágios E17 a E34, com o uso das lectinas PNA (*Arachis hypogaeae*), wheat germen agglutinin (WGA), lectina do feijão de soja (SBA) e *Ricinus communis* (RCA). RCA, SBA, WGA e PNA marcaram a membrana basal do broto do membro do embrião. As lâminas foram pré-incubadas com neuraminidase e o autor observou marcação das lectinas em vasos sanguíneos de PNA com neuraminidase (PNA-Nase), WGA-Nase, WGA e RCA. As células endoteliais mostraram-se positivas somente para WGA.

Nico et al (1998), estudaram a microvasculatura do teto óptico de embriões de galinhas em diferentes dias de desenvolvimento, utilizando lectinas marcadas e detectaram a presença de açúcares reconhecidos pelas lectinas *Ricinus communis* e Wheat germ immunoglobulin (WGA) em capilares, com padrão difuso de expressão.

A expressão de açúcares reconhecidos por RCA observada neste trabalho é compatível com os resultados observados por Nico et al (1998) levando-se em conta que os embriões aqui analisados são de estádios mais iniciais (3 a 4 dias de desenvolvimento), do que aqueles utilizados por Nico (9, 14, 20 e animal adulto) e que a região de estudo também foi diferente. Observamos a marcação subendotelial por RCA na aorta dorsal dos embriões e expressão localizada na membrana basal destas células, corroborando com os resultados de Nico et al (1998) em suas análises ultraestruturais com marcação por esta lectina na membrana basal. Assim, Nico e et al (1998) afirmaram devido aos resultados encontrados em seu trabalho, que glicoconjugados contendo resíduos de β -D-galactose estariam envolvidos na composição das junções íntimas e de membrana basal durante a diferenciação da barreira hemato-encefálica.

Acreditamos, portanto que o mesmo ocorre não só na barreira hemato-encefálica, como na aorta do embrião, também em estádios iniciais e que é possível que não seja restrito apenas à aorta dorsal.

Iruela-Arispe et al (2003) utilizou lectinas para o estudo dos vasos sanguíneos em embriões de galinha, através de perfusão intravascular direta e a análise de secções do embrião. A visualização dos vasos do coração do embrião foi possível com o uso das lectinas: *Lens culinaris* (LCA), Conavalina-A (ConA) e WGA, em embriões de E2,5 a E4. Foi observada a marcação por *Lens culinaris* e *Ricinus communis* em endotélio de artérias, veias e capilares. A *Lens culinaris* mostrou-se de igual afinidade em endotélio de veias e demais vasos do embrião. No endotélio, as lectinas se ligariam às glicoproteínas específicas expressas na superfície luminal e abluminal. Estes autores afirmam que, devido à grande variedade de açúcares expressos no endotélio de vasos em espécies animais diferentes, explicaria-se a interação específica a determinadas lectinas. Nós concordamos com as afirmações supracitadas, já que também observamos diferenças de expressão e topografia dos açúcares estudados através das lectinas aqui empregadas.

Durante este trabalho, buscamos explorar a expressão de resíduos de açúcar na aorta dorsal, revelados por diferentes lectinas fluoresceinadas. A *Abrus precatorius* (ABR) que se liga a resíduos de Gal β 1-3 GalNac, ligou-se às células subendoteliais por toda a aorta, com expressão de aspecto membranar. A *Arachis hypogaeae* (PNA), que se liga a resíduos de galactose, em estádios E16-17 mostrou expressão subendotelial fraca por toda a aorta, porém em estágio ligeiramente posterior (E17) observamos expressão no endotélio, tanto no teto, quanto nos lados do vaso. Observamos também a presença de grupamentos celulares intra-aórticos neste estágio, positivos para esta lectina. Para a lectina *Bandeiraea simplicifolia* (BSI), que se liga a resíduos de Gal α 1-3gal, não houve expressão em nenhuma região da aorta em quaisquer dos estádios estudados. Para a lectina *Lens culinaris* (LCA), que revela resíduos de manose ou glicose, observamos também a expressão por todas as regiões do vaso, subendotelial, de aspecto membranar. A *Ricinus communis* (RCA) liga-se a resíduos de Gal β 1-3/4glcNac β 1 e na aorta mostrou expressão subendotelial por todas as regiões do vaso. Portanto, das lectinas testadas, apenas a ABR, LCA e RCA mostraram a mesma marcação do tipo subendotelial, compatível com membrana basal em todas as regiões do vaso.

Percebemos também que as vacuolizações encontradas no endotélio eram negativas para todas as lectinas testadas, o que é consistente com a negatividade observada às colorações de PAS e AB e reforça a possibilidade desta possuir conteúdo lipoprotéico.

Entretanto, estruturas PAS positivas da região AGM do embrião, mostraram-se

positivas para algumas lectinas, tais como periferia da notocorda (ABR, LCA, RCA), interior da notocorda (ABR), periferia e entre as células do tubo neural (ABR, PNA, LCA, RCA), saco vitelínico (ABR, PNA, LCA, RCA) e nos somitos (PNA).

Ainda em relação à topografia e expressão dos resíduos de açúcar encontrados neste trabalho, observamos a marcação pela lectina *Bandeiraea simplicifolia* intracelularmente na região do complexo de Golgi, em células do mesênquima.

Quanto à composição do citoesqueleto, abordamos a expressão de alfa-actina de músculo liso, desmina e proteína ácida fibrilar glial. A expressão de alfa-actina de músculo liso já foi descrita em células da aorta dorsal de embriões de galinhas, sendo implicada no modelamento e desenvolvimento do vaso (Scall et al., 2009). Estes autores mostraram que a aorta dorsal é o primeiro vaso sanguíneo intraembrionário em vertebrados e que consiste de células endoteliais internas, uma parede exterior de células de músculo liso vasculares e pericitos. Estas células musculares lisas seriam uma população transitória de células da aorta originadas do mesoderma. Desta forma, estes autores propõem um modelo de formação da aorta dorsal que ocorreria em dois momentos: (1) surgimento de células de músculo liso, de caráter transitório no assoalho da aorta, oriundas do mesoderma esplâncnico; (2) células musculares lisas definitivas em toda a aorta de origem do esclerótomo. O grupo acredita que células epiteliais de origem da esplancnopleura transitórias migram através do endotélio aórtico e adotam um fenótipo de células de músculo liso. Em estágio posterior do desenvolvimento, estas células são então substituídas por células de músculo liso secundárias derivadas do esclerótomo. Durante a observação de quimeras de codorna-galinhas para o estudo de linhagens celulares, Scall et al (2009) encontraram células de codornas no assoalho aórtico e que expressam fortemente α -actina de músculo liso no lado ventral da aorta, durante este processo de remodelamento em E16.

Observamos neste trabalho a expressão de α -actina de músculo liso principalmente em células ao redor do assoalho da aorta dorsal, em embriões E16 a E18. Também nestes estádios observamos o mesmo padrão de expressão, porém mais tênue no teto e em grupamentos celulares localizados perto do assoalho e do teto do vaso. A circulação na galinha começa no estágio E2 e o assoalho aórtico adquire função hematopoiética entre os estádios E3 e E4 (Jaffredo et al, 1998). Scall et al (2009) em seu trabalho acredita que as células musculares lisas podem atuar como células estromais para os grupamentos intra-aórticos. Além disso, o grupo acredita que a diferenciação sucessiva de duas populações de células de músculo liso é uma resposta à ação indutiva do endotélio no início da formação da aorta.

A fibronectina mostrou expressão e topografia semelhantes à da α -actina de músculo liso, com expressão principalmente subendotelial no assoalho da aorta, porém de aspecto membranar em embriões de estádios E16 a E18. Observamos também que grupamentos celulares presentes ao lado da aorta e intra-aórticos expressavam fibronectina intercelular.

Ainda em relação ao citoesqueleto, a imonofluorescência realizada para estudar a desmina e o GFAP, exibiu padrões esperados, ou seja, células mesodérmicas positivas para desmina e células ectodérmicas positivas para GFAP. No entanto, nenhum dos dois marcadores apresentou expressão no endotélio ou na parede da aorta dorsal, não parecendo ser significativos no processo de desenvolvimento deste vaso, aos menos nos períodos estudados.

A molécula BMP-4, que é mencionada na literatura como uma das moléculas relacionadas com a diferenciação de linhagens hematopoiéticas (Hogan, 1996), mostrou-se negativa em todas as regiões da aorta, tanto em endotélio hipertrófico, como em grupamentos celulares, o que sugere que esta molécula não participe diretamente no processo de diferenciação hematopoiética do endotélio, na região AGM.

6 CONCLUSÃO

A partir deste estudo histológico de cortes parafinados seriados de embriões de galinha com estádios E16 a E25 (Hamburger e Hamilton) em topografia de região AGM, podemos destacar os seguintes resultados e conclusões:

- Não foram encontradas diferenças significativas dos parâmetros analisados (marcadores de citoesqueleto, superfície celular e lectinas) em nenhuma estrutura desta região.
- O endotélio da aorta dorsal (células endoteliais e membrana basal) foi positivo à reação do PAS, principalmente no assoalho aórtico e essa reatividade aumentou conforme as células se destacavam da membrana basal em direção à luz do vaso, podendo ter relação com o aumento da síntese de sialomucinas, moléculas importantes para a hematopoiese.
- O endotélio do assoalho da aorta dorsal apresentou vacuolizações uniloculares na face basal que não parecem ter natureza protéica ou glicídica e cuja origem e função são obscuras.
- O estudo de marcação de resíduos de açúcar na aorta dorsal através das lectinas destaca a importância dos resíduos Galbeta1-3 GalNAc e Galbeta1-3/4GlcNAcbeta1 na membrana basal, e de Gal nas células endoteliais.
- Alfa-actina de músculo liso e fibronectina compõem o fenótipo de células adjacentes à aorta dorsal que participam do remodelamento do vaso.
- O ácido hialurônico é um elemento importante estando fortemente presente em várias estruturas da região AGM, em especial no mesênquima.

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Artmed. 2002.
- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, et al. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. 102:134–39.
- Blottner, D. E. Linder. Light microscopic studies on spatial and temporal binding of the lectins concanavalin A, wheat-germ agglutinin and peanut agglutinin in early rat odontogenesis. *Arch. Oral Biol*. 1987. 32, 35-42.
- de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J*. 2000. 19:2465–74.
- Carson FL, Hladik C. *Histotechnology. A self-instructional text*. 3rd edition. American Society for Clinical Pathology Press. 2009.
- Chen XD, Turpen, JB. Intraembryonic origin of hepatic hematopoiesis in *Xenopus laevis*. *J. Immunol*. 1995; 154, 2557–2567.
- Cormier F, De Paz P, Dieterlen-Lièvre, F. *In vitro* detection of cells with monocytic potentiality in the wall of the chick embryo aorta. *Dev Biol*. 1986; 118: 167-175.
- Cormier F. Avian pluripotent haemopoietic progenitor cells: detection and enrichment from the para-aortic region of the early embryo. *J Cell Sci*. 1993; 105: 661-666.
- Culling CF. *A Histopathological and Histochemical Techniques*. 3a. Edição. Butterworth & Co. Publishers Ltd. 1974.
- Cumano A, Dieterlen-Lièvre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*. 1996; 86, 907–916.
- Dantschakoff V. Untersuchungen über die Entwicklung von Blut und Bindegewebe bei Vögeln. *Arch. Mikr. Anat. Entwickl.Gesch*. 1908; 73, 117–181.
- Dieterlen-Lievre F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: An experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1975; 33, 607–619.
- Dieterlen-Lièvre F, Martin C. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev.Biol*. 1981; 88, 180–191.
- Dieterlen-Lièvre F, Pardanaud L, Caprioli A, Jaffredo T. Non-yolk sac hematopoietic stem cells: The avian paradigm. New York: Oxford Univ. Press. 2000.
- Dieterlen-Lièvre F, Pouget C, Bollerot K, Jaffredo T. Are intra-aortic hemopoietic cells derived from endothelial cells during ontogeny? *Trends Cardiovasc Med*. 2006; 16: 128-139.

- Fuster M, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutics targets. *Nat. Rev. Can.* 2005; 7: 526–542
- Gallagher, BC. Basal laminar thinning in branching morpho-genesis of the chick lung as demonstrated by lectin probes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986; 94, 173-188.
- Gordon-Keylock S, Medvinsky A. Endothelio-hematopoietic relationship: getting closer to the beginnings. *BMC Biology.* 2011; 9:88.
- Hamburguer V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology.* 1951; 88: 49-22..
- His W. Lecithoblast und angioblast der wirbelthiere. *Abhandl. Ks Ges Wiss Math Phys*, 1900; 22: 171.
- Hoffbrand AV, Moss PAH. *Fundamentos em Hematologia.* 6ª edição. Artmed. 2012.
- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes and Development*, 10, 1996; 1580-1594.
- Huang H, Auerbach R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci*; 1993; 90:10110–4.
- Hungerford JE, Owens G.K, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Developmental Biology.* 1996; 178, 375-392.
- Hurle JM, Ros MA, Hinchliffe JR. Spatial and temporal changes in the pattern of glycosylation of the developing chick limb tissue components as revealed by fluorescent conjugated lectin probes. *Cell Differentiation.* 1998; 24(2):149-58.
- Iruela-Arispe ML, Jilani SM., Murphy TJ, Thai SNM, Eichmann A, Alva JA. Selective Binding of Lectins to Embryonic Chicken Vasculature. *The Histochemical Society, Inc.* 2003; 51(5): 597–604.
- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 1998; 125:4575–83.
- Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C, Brujin M. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Experimental Hematology.* 2005; 33: 1029-1040.
- Jaffredo T, Richard C, Pouget C, Teillet M, Bollerót K, Gautier R, et al. Aortic remodelling during hemogenesis: is the chicken paradigm unique? *Int. J. Dev. Biol.* 2010; 54: 1045-1054.
- Jordan HE. Evidence of hemogenic capacity of endothelium. *Anat. Rec.* 1916; 10, 417–420.
- Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers.* 1995; 26 :219-230
- Laitinen L, Virtanen I, Saxén L. Changes in the glycosylation pattern during embryonic

- development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *Cytochem.* 1987; 35, 55-65.
- Lis H, Sharon N. Lectin as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55:35-67.
- Martin C. Technique d'explantation *in ovo* de blastodermes d'embryons d'oiseaux. *C. R. Seances Soc. Biol.* 1972; 166: 283-285.
- Maximov AA. Untersuchungen über Blut und Bindegewebe, Die frühesten Entwicklungsstadien der Blut und Bindegewebzellen beim Säugetier-Embryo, bis zum Anfang der Blutbildung in der Leber. *Arch Mikr. Anat.* 1909; 73: 444–50.
- Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell*, 1996; 86 (20) 897–906.
- Miller AM. Histogenesis and morphogenesis of the thoracic duct in the chick: Development of the blood cells and their passage to the blood stream via the thoracic duct. *Am. J. Anat.* 1913; 15, 131–198.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 2002; 129: 2773–83.
- Misquith S, Rani PG, Surolia A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269(48): 30393-30401.
- Mody R, Joshi S, Chaney W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 1995; 33(1): 1-10.
- Moore M, Owen JJ. Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* 1967a; 215: 1081-1082.
- Moore M, Owen JJ. Experimental studies on the development of the thymus. *J Exp Med.* 1967b; 126: 715-726.
- Murray P. The development *in vitro* of blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc.* 1932. 111: 497-521.
- Nico B, Quondamatteo F, Ribatti D, Bertossi M, Russo G, Herken R, et al. Ultrastructural localization of lectin binding sites in the developing brain microvasculature. *Anat Embryol* 1998; 197:305–315.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development.* 1996; 122, 1363-1371.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lièvre F. Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development* 1999; 126: 617-627.
- Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy. 3rd edition. Springer Science Business Media, LCC. 2006.

Pelajo-Machado M. Ontogenia do sistema linfo-hematopoético em camundongos Swiss Webster [tese]. Rio de Janeiro. Volumes I e II. Instituto Oswaldo Cruz. 2001.

Peumans WJ, Damme VEJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. 1995; 109, 347-352.

Rüdiger H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*. 1998; 161, 130- 152.

Sabin FR. Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Carnegie Contrib. Embryol*. 1917; 6, 61–124.

Sabin FR. Studies on the origin of blood-vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie contribution to embryology*, 1920; 27: 214-262.

Scall M, Wiegrefte C, Christ B, Huang R. Remodeling of Aortic Smooth Muscle During Avian Embryonic Development. *Developmental Dynamics*. 2009; 238:624–631.

Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 1989; 246: 227-234.

Sharon N, Lis H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem*. 1995; 30: 59-75.

Silva LMR, Whiteside TL, Ball ED. The role of natural killer cells in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Journal of Hematotherapy*. 1995; 4: 269-279.

Silveira PAA. Hematopoese: alguns aspectos. *J. Bras. Nefrol*. 2000; 22 (5): 5-6.

Spangrude GJ, Brooks DM. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood*. 1993; 82: 3327–3332.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241: 58–62.

Swiers G, Speck NA, de Bruijn MF. Visualizing Blood Cell Emergence from Aortic Endothelium. *Cell Stem Cell*. 2010; 6(4): 289-90.

Tavian M, Coulombel L, Luton D, San Clemente H, Dieterlen-Lièvre F, Péault B. Aorta-associated CD341 hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*. 1996; 87, 67–72.

Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, Kinoshita T, Miyajima A. Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*. 2002; 99:1190–6.

Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J*. 1997; 11: (4) 248–55.

Varki A, Cummings RD, Esko JD et al. Historical Background and Overview Essentials of

Glycobiology. 2nd edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.

Varki A, Freeze HH, Vacquier VD. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.


Wiegreffe C, Christ B, Huang R, Scaal M. Sclerotomal origin of smooth muscle cells in the wall of the avian dorsal aorta. *Dev Dyn.* 2007; 236: 2578–2585.

Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes and Development.* 1995. 9, 2105-16.


Wood HB, May G, Healy L, Enver T, Morriss-Kay GM. CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood.* 1997; 90(6): 2300-11.

Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj.* 2009; 26: 899-913.

ANEXO A- Comitê de Ética para pesquisa com animais



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



CEUA
FIOCRUZ
**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2010.

Carta Nº 60/ 2010 -CEUA/FIOCRUZ.

Ao: Dr. Marcelo Pelajo Machado

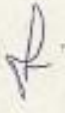
Referência: resposta ao Memo nº 167/10 LABPAT/IOC – formas embrionárias.

Prezado Doutor:

A CEUA/FIOCRUZ, enquanto aguarda a regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre os procedimentos envolvendo formas embrionárias e fetais e a resposta do CONCEA à consulta realizada pela CEUA em 11/05/2010 sobre o tema, adotará regra similar à da legislação britânica (uma das mais severas leis internacionais de uso científico de animais). Portanto, a submissão à CEUA de Projetos de Pesquisa que utilizam animais vertebrados em suas formas imaturas será necessária nos seguintes casos:

- 1 - Mamíferos, pássaros e répteis - da metade até o final da gestação ou período de incubação
- 2- Peixes e anfíbios - a partir do momento em que sejam capazes de se alimentarem de forma independente.

Será também necessário submeter o Projeto de Pesquisa à CEUA nos seguintes casos:



Comissão de Ética no Uso de Animais
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
 Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

3 – Mesmo que o animal tenha sido manipulado antes dos estágios definidos em 1 ou 2 e for mantido vivo até estes estágios de desenvolvimento ou se o procedimento puder resultar em dor, sofrimento, angústia ou prejuízo permanente quando o animal atingir estágios de desenvolvimento definidos nos itens 1 ou 2.

Assim, por exemplo, em um estudo sobre a propagação de vírus em ovos embrionados de aves (embryonated bird eggs):

- a) se a inoculação e a morte se derem antes da metade da incubação – **NÃO HÁ NECESSIDADE DE LICENCIAMENTO PELA CEUA;**
- b) se a inoculação for realizada antes da metade da incubação mas o embrião sobreviver e for mantido vivo na segunda metade do período de incubação – **LICENCIAMENTO PELA CEUA SERÁ NECESSÁRIO.**


Atenciosamente,


Drª. Norma Labarthe


Coordenadora CEUA/FIOCRUZ

ANEXO B – Termo de submissão à revista científica

10/10/12 ScholarOne Manuscripts

 Glycobiology

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as Marcelo Pelajo Machado

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Glycobiology*.

Manuscript ID: GLYCO-2012-00174

Title: Expression of Sugar Residues on the Endothelial Cells of the Dorsal Aorta from the Aorta-Genital Ridge-Mesonephos Region of Gallus gallus domesticus early embryos.

Authors: Alzuela Moreno Martinez, Patricia
Tavares Guedes, Priscila
Euzebio Pereira Dias de Oliveira, Barbara Cristina de Carvalho, Jorge José Pelajo Machado, Marcelo

Date Submitted: 10-Oct-2012

 Print  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved. ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)