



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

**BOLSA UNIVERSIDADE DE LISBOA / FUNDAÇÃO AMADEU DIAS
2008-2009**

Tutora: Prof. Maria Gabriela Rodrigues
Laboratório: Biologia do Desenvolvimento – FCUL/CBA

Determinação do padrão de distribuição de algumas moléculas envolvidas na somitogénese

Ana Isabel de Melo Bernardo
Biologia

Introdução

Muito do conhecimento actual acerca do desenvolvimento embrionário dos vertebrados assenta na experimentação realizada em embriões de galinha (*Gallus gallus*). Esta espécie constitui um excelente modelo para o estudo destes processos, já que o seu desenvolvimento ocorre fora do útero materno, o que facilita o acesso ao embrião. Além disso, é relativamente fácil promover as condições necessárias ao desenvolvimento embrionário dos indivíduos num laboratório, recorrendo a uma incubadora que mantenha as condições de temperatura e humidade ideais.

Um ponto interessante na embriogénese dos vertebrados é a somitogénese. Este processo, evolutivamente homólogo à segmentação dos invertebrados, é caracterizado pela formação de pares de agregados de células paralelos ao tubo neural, os sómitos (Gossler e Hrabe de Angelis, 1998), que influenciam a metamerização de estruturas das quais são percursos, como seja o músculo esquelético e as vértebras, e de estruturas adjacentes, como seja a imposição de limites na migração das células da crista neural.

Actualmente, sabemos que há uma base molecular complexa na formação destas estruturas, que se formam a partir de uma parte da mesoderme paraxial, a mesoderme pré-somítica (PSM) que se estende desde o nó de Hensen até ao último sómito formado. Assim, com o avanço da gastrulação, as células que darão origem ao sómito ingressam para a zona segmentar, formando-se um novo par de sómitos a cada 90 minutos. Os sinais moleculares, nos quais estão envolvidos vários genes expressos de forma cíclica ou continuada, certificam que as células recebam informação relativamente ao momento em que a transição entre mesênquima e epitélio deverá ocorrer, sendo esta a transformação celular mais importante deste processo (Gilbert, 2006).

A somitogénese, além destas transformações ao nível celular, envolve ainda a migração e proliferação das células que nela estão envolvidas. Estes acontecimentos estão em parte relacionados com a proteína AKT que promove a o controlo da sobrevivência e metabolismo celular (Fayard, E. et al 2005).

As células epiteliais têm características específicas que contribuem para o desempenho das suas funções, como seja o revestimento de superfícies, funcionando como barreira selectivamente permeável aos iões e moléculas. Como características principais temos a forma do núcleo, que normalmente acompanha a forma da célula, e o facto de estas células estarem envolvidas por tecido conjuntivo adjacente. Estas

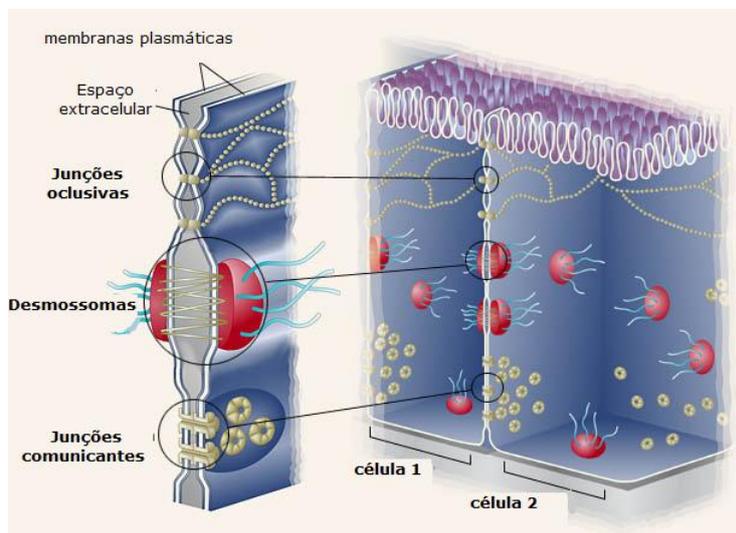


Fig.1 – Esquema ilustrativo do tipo de ligações célula a células que se estabelecem especialmente ao nível células epiteliais. Neste esquema estão evidenciados os tipos de junções oclusivas, formadas na zona adjacente a porção apical das células, junções desmossomais, e junções comunicantes, que permitem a passagem de pequenos iões e moléculas entre células vizinhas.

células têm uma polaridade bem definida, sendo a porção em contacto com a matriz extracelular designada de porção basal, e a porção oposta designada por porção apical.

A comunicação e o contacto entre células vizinhas assumem uma importância extrema neste tipo de tecido (fig. 1). Assim, a evolução contribuiu para o aparecimento de especializações da membrana plasmática e dos seus constituintes, no sentido de permitir o contacto célula-célula e célula-matriz. As junções intercelulares, apesar de presentes em todos os tipos de tecidos, desempenham nos epitélios um papel fundamental: além de funcionarem como locais de adesão, funcionam como vedantes ou até mesmo como canais de comunicação célula a célula (Junqueira L.C. e Carneiro J., 2008).

Estas junções são compostas por um grupo diverso de proteínas, designadas genericamente por CAM (moléculas de adesão celular), que englobam proteínas diversas como sejam as integrinas, selectinas, caderinas, etc.

Do ponto de vista funcional, as junções celulares podem ser de oclusão, estabelecendo-se entre células vizinhas numa zona lateral, mesmo abaixo da zona apical da célula. Estas junções previnem a difusão de macromoléculas e iões ao longo do epitélio. São constituídas por estreitas bandas de proteínas membranares que rodeiam a célula por completo, e estabelecem contacto com bandas semelhantes nas células adjacentes, este contacto é feito através de moléculas especializadas (occludinas, claudinas e outras moléculas de adesão celular (JAM's)). Um exemplo deste tipo de moléculas é a ZO-1 (*zonula occludens 1*) (fig.1).

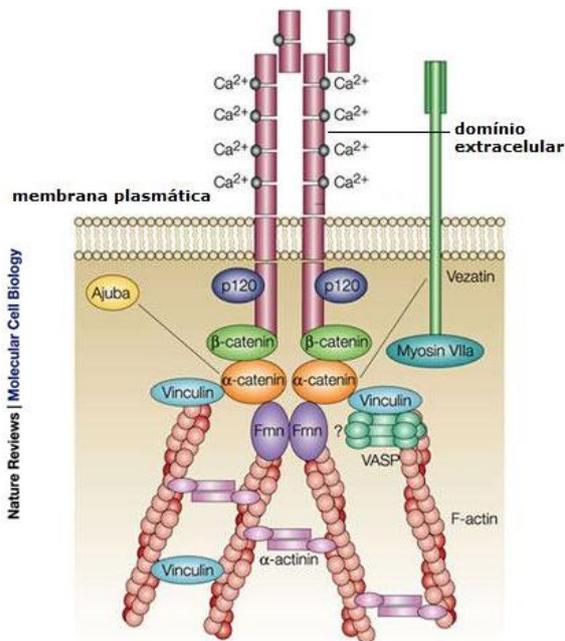


Fig.2 – Esquema ilustrativo do tipo moléculas intermediárias entre as caderinas e o citoesqueleto. Neste esquema evidencia-se a existência de um complexo de células intermediárias (βcatenina, Vinculina, αcatenina, VASP, p120, Fmn) que possibilita a ligação das caderinas, ao nível das junções adesivas, com o citoesqueleto de actina da célula.

Um outro tipo de junções que se estabelecem, são as junções de adesão, constituídas por proteínas de adesão transmembranar da família das caderinas, que estabelecem contacto no interior da célula com os filamentos de actina, regulando processos intracelulares, através de um complexo constituído por diferentes moléculas (cateninas, VASP, vinculina, α-actinina, etc.). Este tipo de ligações é dependente do cálcio, e está directamente relacionado com a diferenciação dos tecidos. O estabelecimento de ligações de N-caderina entre as células constituintes do sómito assume um papel de extrema importância na compactação e manutenção do sómito como agregado celular. Os desmossomas também fazem parte deste tipo de ligação, sendo constituídos por proteínas da família das caderinas

(desmogleína e desmocolina), que estabelecem a ligação transmembranar às proteínas de ancoramento intracelular (placoglobina e desmoplaquina) (fig.2).

As junções comunicantes são constituídas por conexões, que permitem a comunicação de pequenas moléculas e iões entre as células.

Além de proteínas capazes de estabelecer a ligação entre células vizinhas, a célula apresenta receptores na sua superfície capazes de se ligar a componentes da matriz extracelular.

A matriz celular é composta essencialmente por proteoglicanos, colagénios, glicoproteínas e glucosaminoglicanos. Um exemplo dessas glicoproteínas que constitui a matriz extracelular é a fibronectina. Esta molécula é produzida pelas células em forma de dímero. A correcta organização da matriz de fibronectina envolve receptores membranares – as integrinas – que a capturam extracelularmente esticando a matriz, e abrindo novos locais de ligação entre as integrinas e a fibronectina, promovendo desta forma a fibrilogénese da fibronectina. Esta matriz assume uma importância extrema na migração celular, separação de tecidos diferentes, evitando a comunicação entre os mesmos, reforçando fronteiras e polarizando as células (Pankov e Yamada, 2002).

As integrinas, a maior família de receptores da matriz extracelular, forma dímeros compostos por uma cadeia α e uma cadeia β , ambas necessárias para o estabelecimento de ligações. A ligação destes receptores ao citoesqueleto é feita por proteínas intermédias que constituem um complexo proteico responsável por essa ligação. Este complexo é constituído por moléculas como sejam a vinculina, talina, paxilina, tensina, FAK (focal adhesion kinase), entre outras (Lodish et al, 2003) (fig.3).

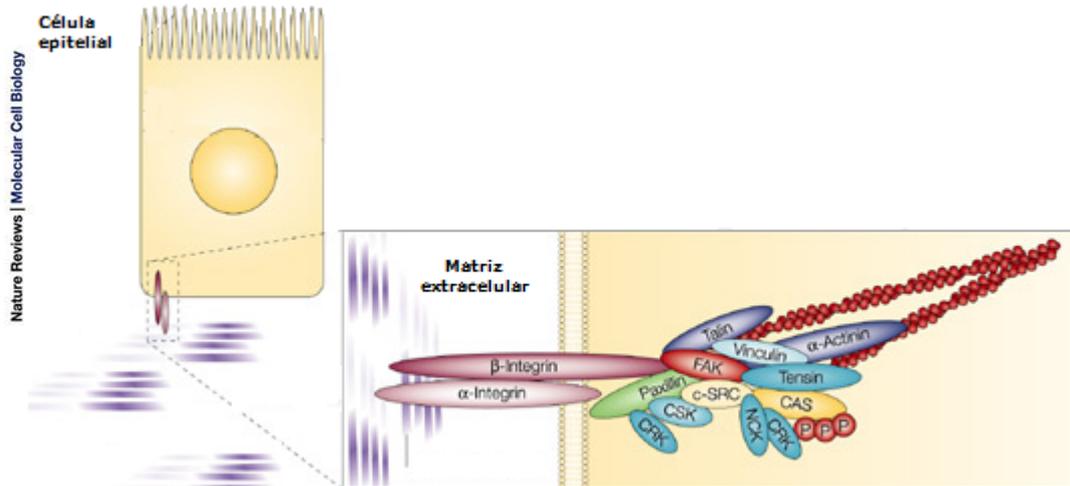


Fig.3 – Esquema ilustrativo do tipo moléculas intermediárias entre as integrinas e o citoesqueleto. Neste esquema evidencia-se a existência de um complexo de células intermediárias (Paxilina, CSK, CRK, FAK, c-SCR, vinculina, talina, Tensina, NCK, CAS) que possibilita a ligação das integrinas, ao nível da porção basal das células, com o citoesqueleto de actina da célula.

Em 2007, o grupo de trabalho de Sólveig Thorsteinsdóttir e Gabriela Rodrigues do Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, publicou um artigo que deu conta da importância da matriz de fibronectina na formação dos sómitos (Rifes et al. 2007). O modelo anteriormente aceite defendia que a existência do factor paraxis era fundamental para a epitelização dos sómitos (Burgess et al., 1996). No entanto, este modelo não considerava que a expressão de paraxis

surgia na ausência de ectoderme, e que a formação de sómitos não ocorria nestas condições. Além disso, este modelo ignorava os dados existentes sobre a fibronectina que indicavam que knock outs de fibronectina em *Mus musculus*, *Xenopus larvae*, e *Danio renio* não formavam sómitos.

Assim, começaram por isolar PSMs, para estudo, de três formas diferentes: usando pancreatina e dispase, que degradavam a matriz de fibronectina, e colagenase que isolava as PSMs sem danificar essa mesma a matriz. Nas PSMs onde a matriz de fibronectina se mantinha intacta, houve formação do número correcto de sómitos. Sabendo que a ectoderme produz fibronectina, e estando esta ausente após o isolamento destas PSMs com pancreatina, adicionaram fibronectina exógena, verificando que a capacidade de formar sómitos melhorava. Perceberam que o receptor de fibronectina, integrina $\alpha 5\beta 1$, estava localizado em todas as células da PSM. Para confirmarem estes dados usaram um fragmento de 70 kDa, capaz de inibir a fibrilogénese da fibronectina, o que permitiu confirmar a importância desta molécula na formação dos sómitos, visto que os explantes cultivados com este fragmento não formavam o número de sómitos suposto. O papel da fibronectina na agregação e manutenção das fendas entre os sómitos foi desta forma demonstrado.

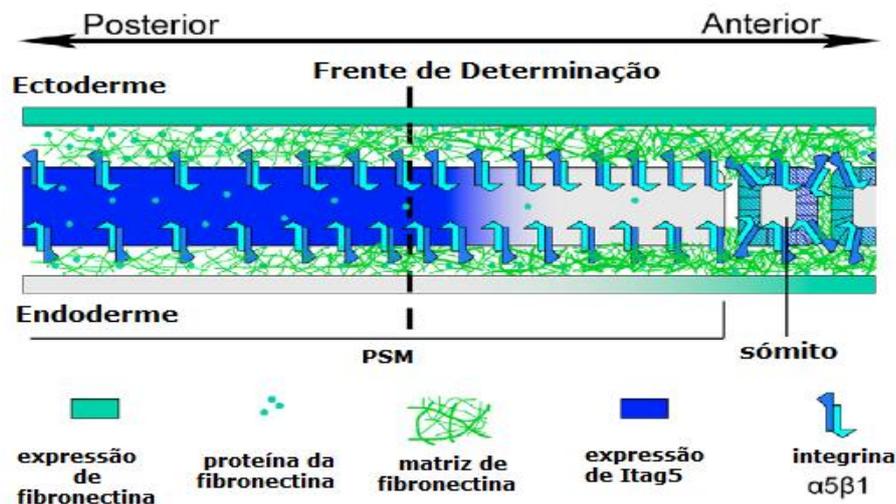


Fig. 4– Modelo de ligação da fibronectina à PSM do embrião de galinha, proposto por Rifés et al. (2007). Corte sagital de uma PSM, com um sómito epitelial formado, mostrando a ectoderme e endoderme adjacentes. Este modelo sugere que ligação entre a matriz de fibronectina à PSM ocorre inicialmente no lado posterior, e a associação desta matriz, quando suficientemente forte, permite a formação do sómito. A ectoderme é a maior fonte de fibronectina para a formação da matriz, havendo uma contribuição muito pequena da PSM na sua produção. A expressão de integrina $\alpha 5\beta 1$, é essencial para o processo de associação.

Assim, de um modo geral, o trabalho desta equipa dirige-se para a compreensão da influência da matriz extracelular no processo da somitogénese, especialmente no que toca ao papel específico que esta molécula terá na correcta epitelização dos sómitos. A investigação que têm desenvolvido neste sentido já permitiu caracterizar as células dos sómitos do ponto de vista de adesão celular (cateninas e β -cateninas) e do citoesqueleto de actina (Martins G. et al. 2009).

O meu trabalho consistiu especificamente na procura de padrões de distribuição de outras moléculas (talina, vinculina, paxilina, ZO-1 e AKT) que poderão estar directamente envolvidas na somitogénese, e que poderão alterar a sua localização quando se induz a perturbação da matriz de fibronectina, da qual depende a correcta formação de sómitos.

Materiais e Métodos

Embriões

Foram incubados ovos de galinha (*Gallus gallus*) fertilizados numa atmosfera húmida a 38°C durante aproximadamente 48 horas, até atingirem o estado HH13 (Hamburger e Hamilton. 1992).

Manipulação de embriões

Cultura de explantes

A partir de embriões no estado pretendido, foram obtidos explantes posteriores com 4 sómitos cada. Os explantes foram colhidos em tampão fosfato (PBS) completo com Mg^{+2} e Ca^{+2} , e posicionados em filtros de policarbonato de 0,8 μm de poro colocados sobre meio de cultura M199 Earls Salts (Invitrogen) com 10% soro de galinha (Invitrogen), 5% soro de bovino fetal (Invitrogen) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen) (Palmeirim I. et al. 1997) Os explantes experimentais foram incubados no mesmo meio de cultura com adição de 100 $\mu g/mL$ de fragmento de fibronectina de 70 KDa (Sigma), e os controlos foram incubados em meio com Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma).

Os explantes foram cultivados durante 6 horas, numa estufa húmida, com 5% CO_2 a 38°C.

Preparação para cortes no micrótomo de congelação

Os embriões e os explantes foram fixados durante a noite em FISH 0,2 % (4% sacarose, 0,12 mM $CaCl_2$, 0,07M NaH_2PO_4 , 0,023 M $Na_2H_2PO_4$, 0,2% paraformaldeído (PFA)) e PFA 4%, respectivamente.

Foram posteriormente lavados e mantidos em T1 (4% sacarose, 0,12 mM $CaCl_2$, 0,07M NaH_2PO_4 , 0,023 M $Na_2H_2PO_4$) durante a noite a 4°C. Lavaram-se e mantiveram-se em T2 (15% sacarose, 0,12 M PBS) durante a noite a 4°C.

Retirou-se T2 e adicionou-se T3 (15% sacarose, 0,12 M tampão fosfato (PBS), 7,5%) aquecido a 37°C, deixando à mesma temperatura durante ± 1 hora, até que os embriões afundassem na solução T3.

Colocou-se T3 numa caixa de petri com fundo duro de agar, colocando-se posteriormente os embriões e os explantes orientados, marcando a parte anterior dos mesmos, para orientação no micrótomo de congelação.

Colocaram-se os blocos individualizados em formas de folha de alumínio, ficando a face dorsal voltada para cima.

Para uma correcta congelação dos mesmos, foi usado um recipiente de metal com Isopentano (quantidade suficiente para apenas cobrir o fundo), envolvido por gelo seco. Mergulharam-se as formas com os blocos lentamente no isopentano, esperando a sua congelação gradual, até que o bloco atingisse um aspecto opaco e uniforme. As formas foram armazenadas a -80°C.

Imunohistoquímica

Realizaram-se protocolos de imunohistoquímica usando anticorpos monoclonais contra a Vinculina (V4505 Sigma, 1:100), Talina (8e6 DSHB, 1:100), Fibronectina (F6140 Sigma, 1:400), e anticorpos policlonais contra a Fibronectina

(F3648 Sigma, 1:400), Paxilina (abee54 ABcam, 1:100), AKT1 (ab38449 ABcam, 1:100) e ZO-1 (40-2200, 1:200). Os anticorpos secundários usados foram fragmentos IgG F (ab')₂ conjugados com Alexa Fluor 488 (emissão de luz verde) e 568 (emissão de luz vermelha) (Molecular Probes, 1:1000).

Para o processo, foram obtidas secções transversais e sagitais de 12 µm, para embriões inteiros e explantes respectivamente, no micrótomo de congelação (Bright Clinicut 3020). As lâminas foram deixadas a secar durante 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas em PBS 1x 3 vezes durante 10 minutos. Para conseguir a permeabilização do tecido de modo a permitir a subsequente entrada dos anticorpos, as lâminas foram colocadas em Triton 0,2 % em PBS durante 20 minutos, sendo novamente lavadas em PBS 1x. Para bloquear ligações inespecíficas foi usado soro de cabra (NGS), para os anticorpos contra Vinculina, Talina, ZO-1, Paxilina e Pi3 K e BSA 5% para o anticorpo contra fibronectina, durante 30 minutos.

A incubação com anticorpo primário em PBS BSA 1% foi realizada durante a noite. Efectuaram-se novas lavagens com PBS x1 3 vezes durante 10 minutos cada.

Colocou-se o anticorpo secundário respectivo em BSA 1% durante 1 hora à temperatura ambiente.

Lavou-se novamente com PBS 4x, para eliminar o ruído de fundo, e PBS 1 x durante 10 minutos.

Mergulharam-se as lâminas num recipiente com DAPI (emissão luz azul; DAPI, 5 µg/ml em PBS 1% Triton X-100) durante 30 seg, para obter a coloração dos núcleos, e montou-se em propilgalacto.

Aquisição de imagens

As imagens foram adquiridas a partir do microscópio de fluorescência Olympus BX60 equipado com óptica Nomarski e epifluorescência, acoplado a uma câmara fotográfica digital Olympus DP50 e processadas por Adobe Photoshop CS4 e Image J.

Resultados/Discussão

Caracterização morfológica

A técnica de imunohistoquímica de fluorescência permite detectar determinadas moléculas de interesse devido ao uso de anticorpos específicos contra essas moléculas, que se ligam às mesmas, e os quais são reconhecidos por anticorpos secundários, que reconhecem os primários, e que se encontram associados a fluorocromos que emitem luz de determinado comprimento de onda quando excitados devidamente.

A aplicação do protocolo de imunohistoquímica, usando anticorpos para as várias proteínas em estudo permitiu caracterizar morfológicamente os tecidos analisados. A distribuição destas moléculas nos vários tecidos analisados determina um padrão de distribuição das mesmas, constituindo um auxílio importante na compreensão do comportamento celular ao longo da formação do embrião de galinha, especialmente ao nível da somitogénese. Este acontecimento é marcado por profundas transições entre células epiteliais e células mesenquimatosas, o que trará como consequência a alteração da distribuição destas moléculas durante os acontecimentos que se vão sucedendo.

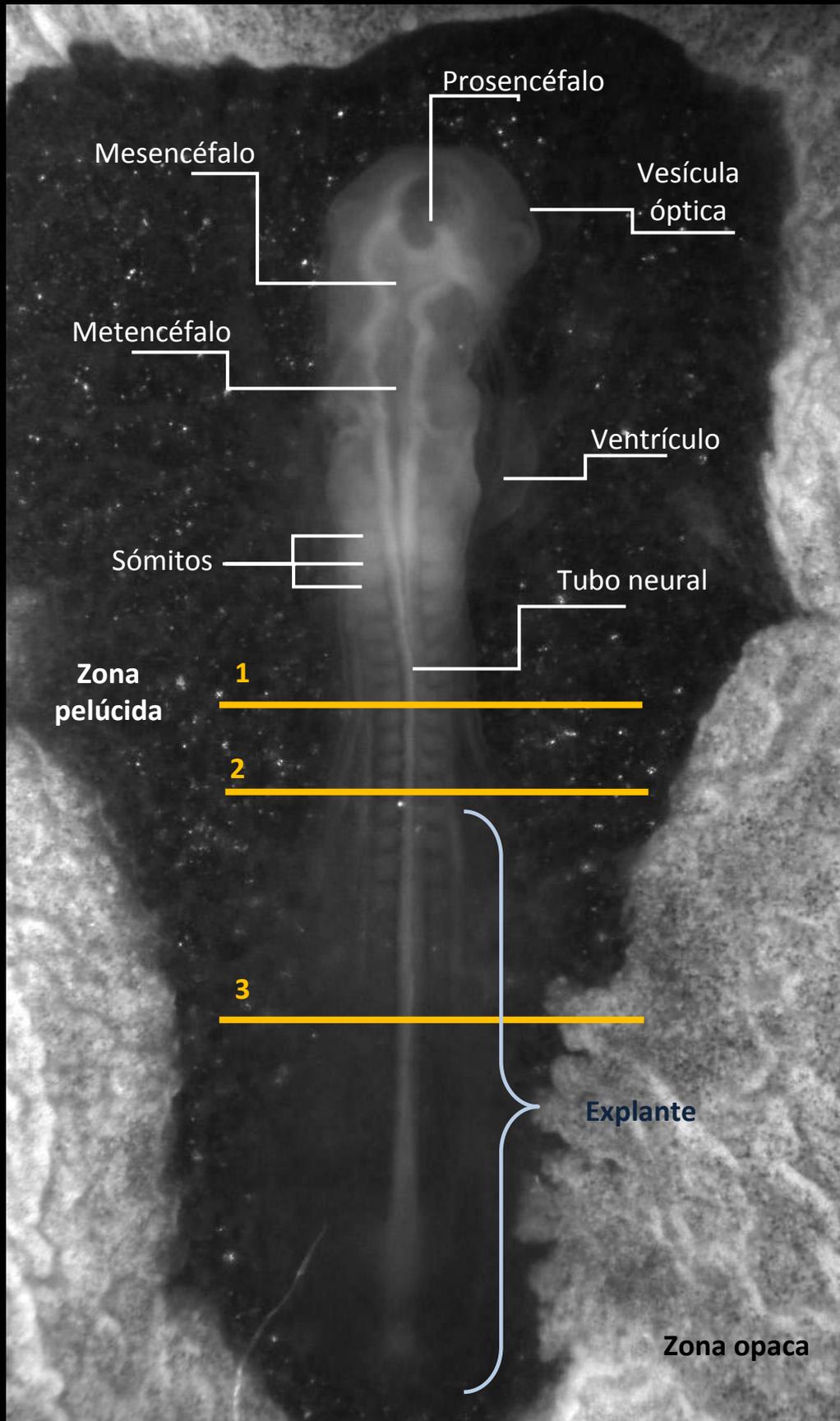


Fig.5 – Embrião de galinha E13 HH com 48h de incubação. Este embrião apresenta 17 sómitos. Os cortes transversais, que serão apresentados em seguida, foram obtidos nas 3 zonas indicadas (1, 2, 3). Em cada sequência de imagens apresentadas nas próximas figuras a ordem das secções acompanha esta sequência de cortes. A chaveta azul indica o local onde foram feitos os explantes para cultura.

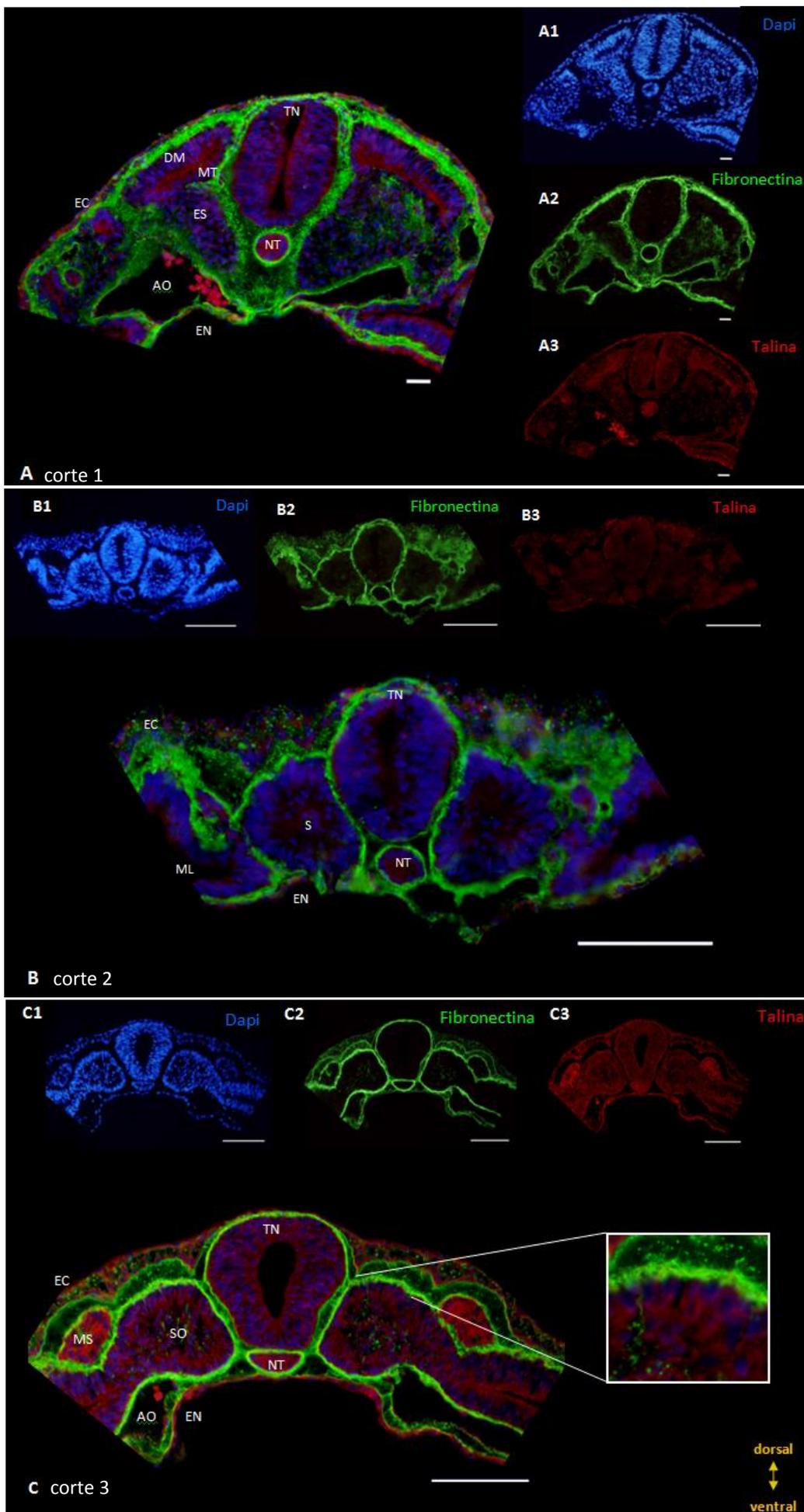


Fig.6 – Distribuição da talina e da fibronectina em diferentes secções de um embrião de galinha. (A) Na parte anterior do embrião, onde é visível o dermamiótomo (DM) e o esclerótomo (ES), a talina encontra-se na periferia das células e também ao nível tubo neural (TN) e notocorda (NT). A Fibronectina preenche os espaços entre as células, marcando fronteiras entre os tecidos. **(B)** No sómito (S) a talina concentra-se na zona central do mesmo, enquanto que a fibronectina o rodeia por completo. **(C)** No sómito zero, a distribuição da talina revelou-se mais dispersa. Todas as barras de escala representam 100 µm. (AO) Aorta, (EC) Ectoderme, (EN) Endoderme, MS (Mesonefro), MT (miótomo).

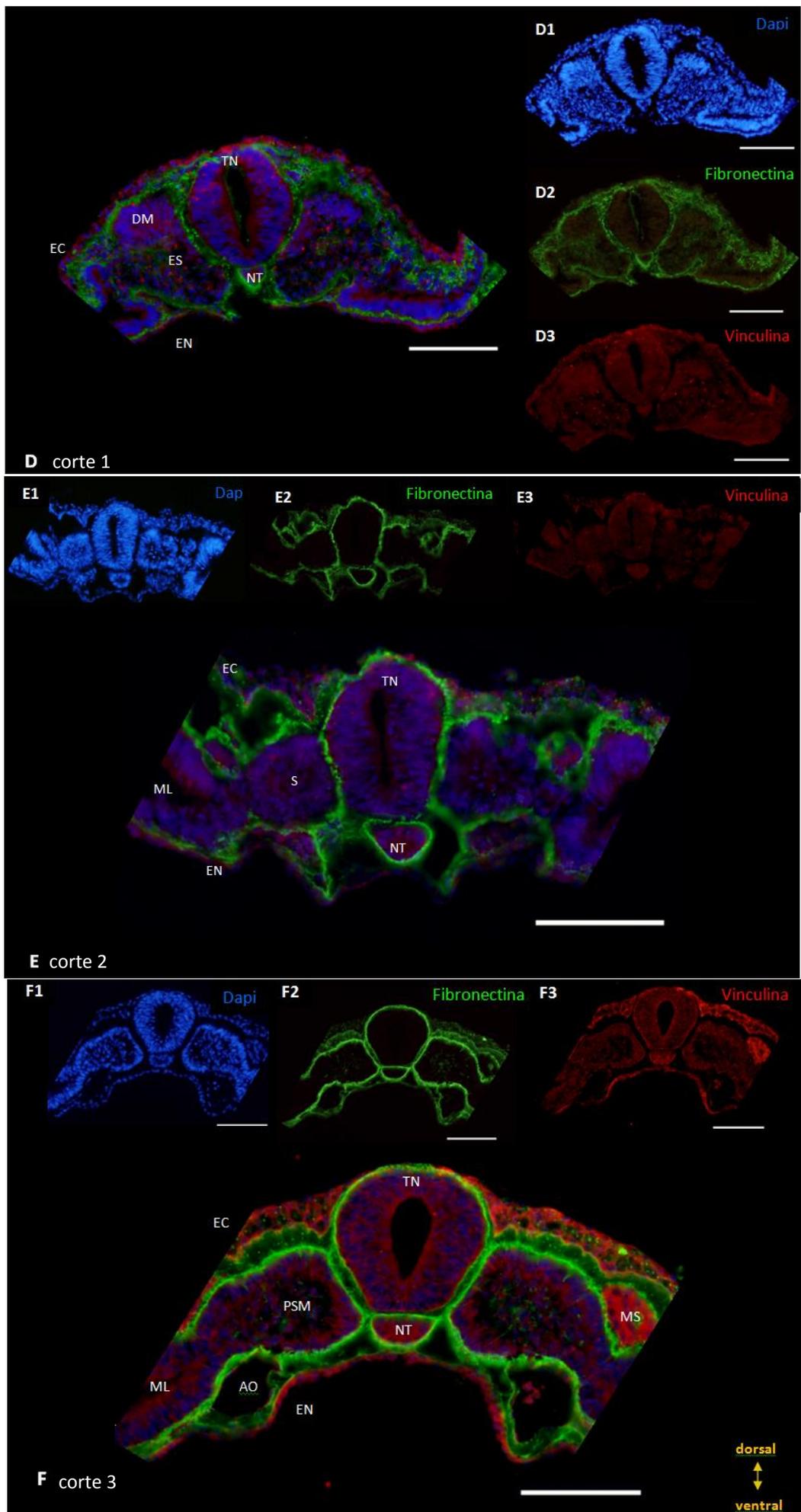


Fig.7 – Distribuição da vinculina e da fibronectina em diferentes secções de um embrião de galinha. (D) Na parte anterior do embrião, onde é visível o dermamiótomo (DM) e o esclerótomo (ES), a vinculina encontra-se na superfície apical de todos os tecidos epiteliais, tubo neural (TN) e notocorda (NT). A fibronectina preenche os espaços entre as células, marcando fronteiras entre os tecidos. **(E)** No sómito (S) a vinculina concentra-se na zona central do mesmo, enquanto que a fibronectina o rodeia completamente. **(F)** No sómito 0, a distribuição da vinculina não é central, revelando-se mais dispersa. Todas as barras de escala representam 100 µm. (AO) aorta, (EC) ectoderme, (EN) endoderme, (MS) mesonefro.

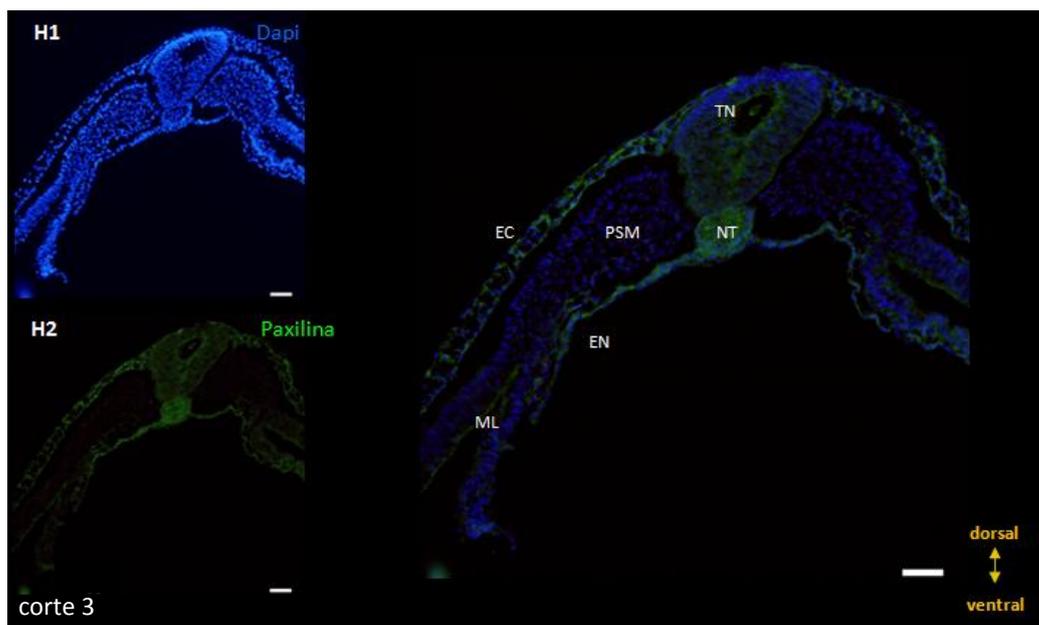
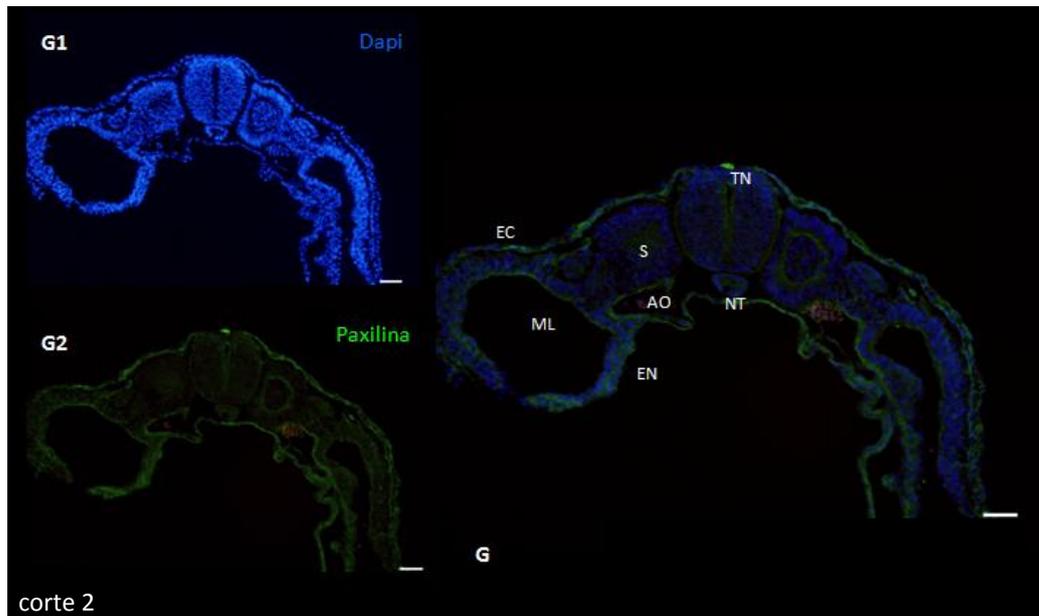


Fig.8 – Distribuição da paxilina em diferentes secções de um embrião de galinha. (G) No sómito maduro (S) a Paxilina concentra-se na zona central do mesmo, concentrando-se também ao nível dos epitélios endoderme (EN), mesoderme lateral (ML), ectoderme (EC), tubo neural (TN) e notocorda (NT). **(H)** Na PSM, a Paxilina está ausente, no entanto a sua localização nos epitélios permanece a mesma. Todas as barras de escala representam 100 µm. (AO) Aorta.

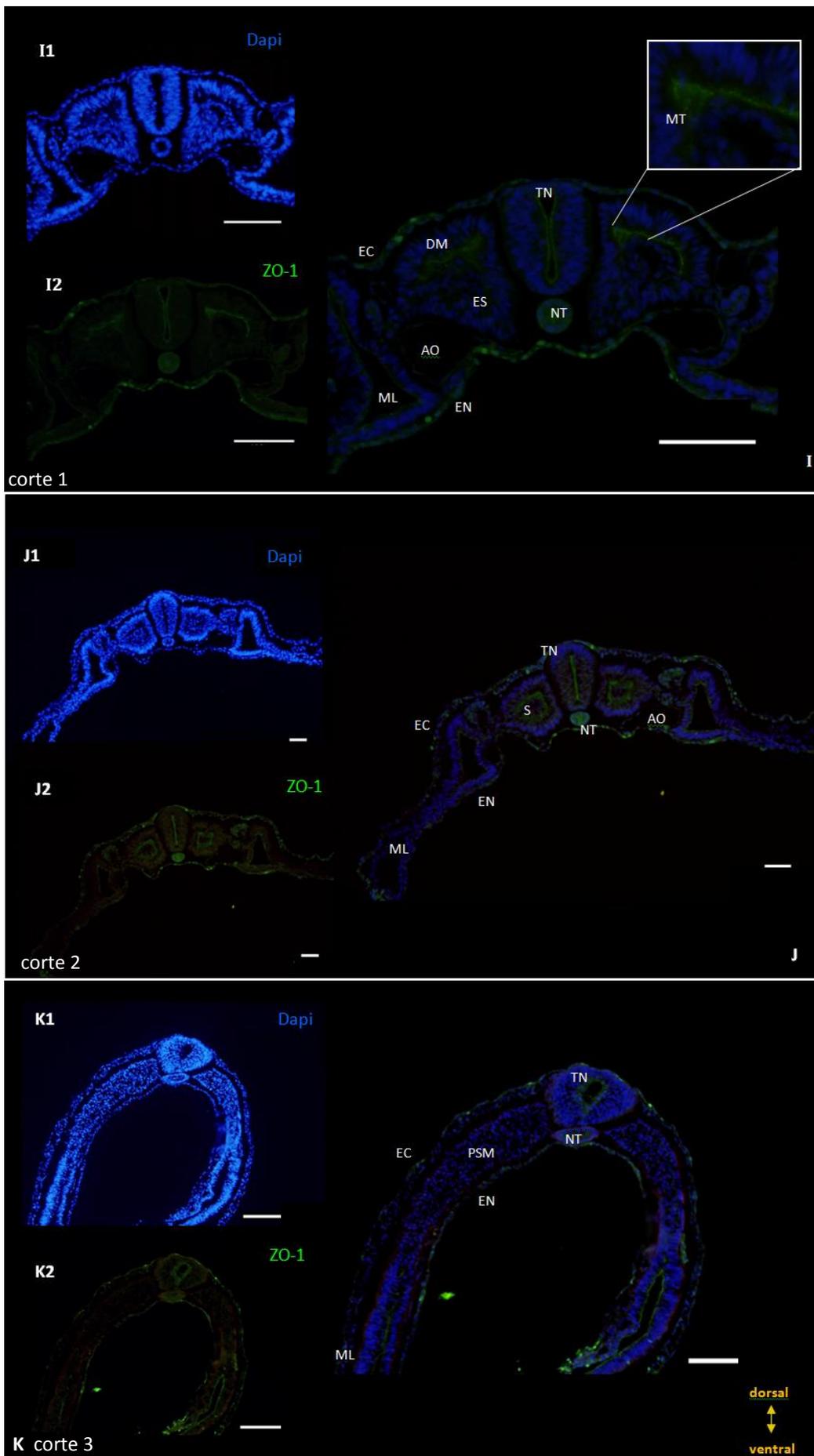


Fig.9 – Distribuição de ZO-1 em diferentes secções de um embrião de galinha. (I) Na parte anterior do embrião, onde é visível o dermamiótomo (DM) e o esclerótomo (ES), a ZO-1 encontra-se na superfície apical de todos os tecidos epiteliais, tubo neural (TN) e notocorda (NT). **(J)** No sómito maduro (S) ZO-1 concentra-se na zona central do mesmo, mantendo a localização nos epitélios. **(K)** Na PSM não existe ZO-1. No entanto, a sua localização nos epitélios permanece a mesma, especialmente ao nível da mesoderme lateral. Todas as barras de escala representam 100 μ m. (AO) Aorta, (EC) Ectoderme, (EN) Endoderme, MT (miótomo).

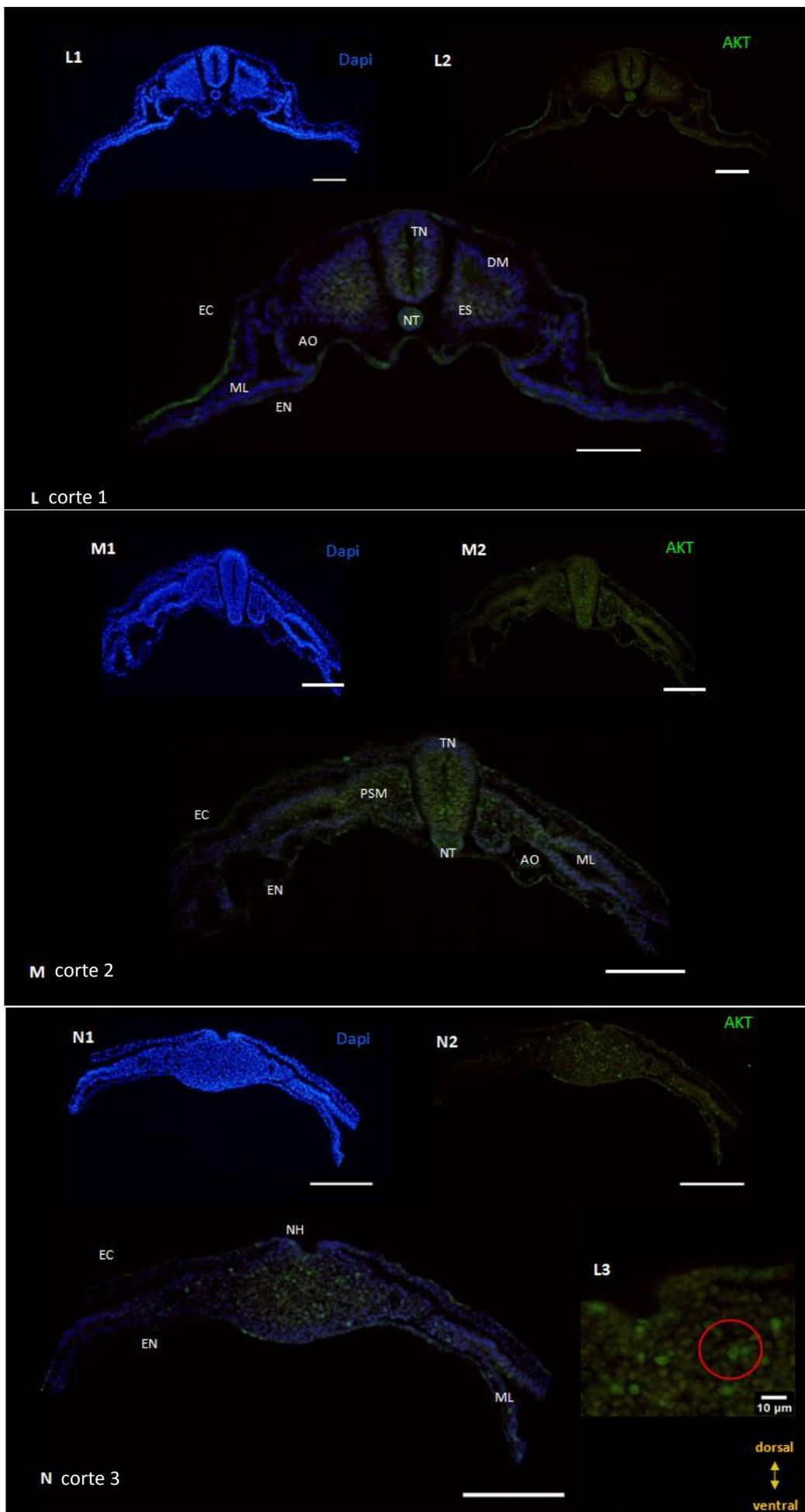


Fig.10 – Distribuição da AKT em diferentes secções de um embrião de galinha. (L) Na parte anterior do embrião, onde é visível o dermamiótomo (DM) e o esclerótomo (ES), a presença de AKT é quase nula, localizando-se sobretudo no centro do esclerótomo. **(M)** Na transição entre PSM e sómito maduro AKT concentra-se na zona central do mesmo, e no Tubo Neural (TN). **(N)** Numa parte mais posterior do embrião, a distribuição da AKT é bastante evidente no conjunto de células centrais, especialmente em células que se encontram em divisão. (L3) O círculo vermelho indica uma anafase. Todas as barras de escala representam 100 µm. (AO) aorta, (EC) ectoderme, (EN) endoderme, (ML) mesoderme lateral.

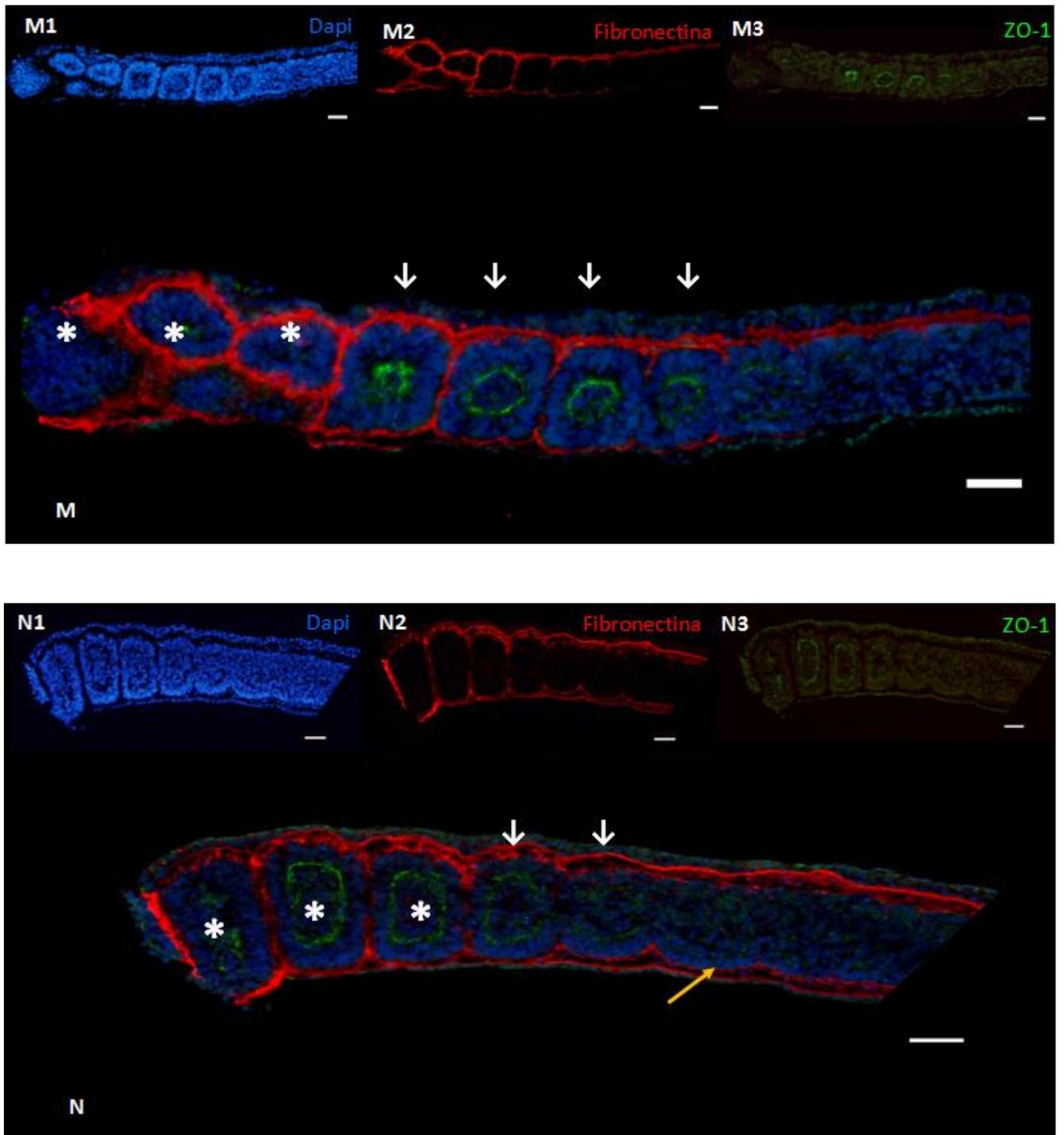
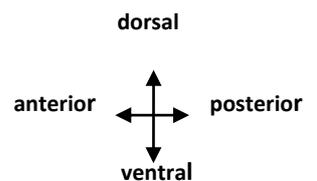


Fig.11 – Distribuição da fibronectina e ZO-1 em secções longitudinais de explantes posteriores de embriões de galinha com quatro sómitos cultivados em meio de cultura com BSA (M) e fragmento 70 kDa (N) durante 6 horas. (M) Formaram-se 4 sómitos durante o tempo da cultura (indicados pelas setas brancas). A distribuição de ZO-1 nos novos sómitos formados seguiu a mesma distribuição dos sómitos já existentes, localizando-se na zona central dos mesmos. A fibronectina também manteve a sua distribuição, rodeando todos os sómitos. **(N)** Durante as 6 horas de cultura, formou-se apenas um sómito completo, havendo início da formação de um segundo novo sómito (setas brancas). A distribuição de ZO-1 sofreu alteração, a sua localização central no sómito ficou destabilizada no sómito em formação e bastante dispersa na PSM adjacente. A matriz de fibronectina ficou menos compacta, não envolvendo o sómito formado. As estrelas indicam os sómitos existentes antes de cada cultura. Todas as barras de escala representam 100 µm.



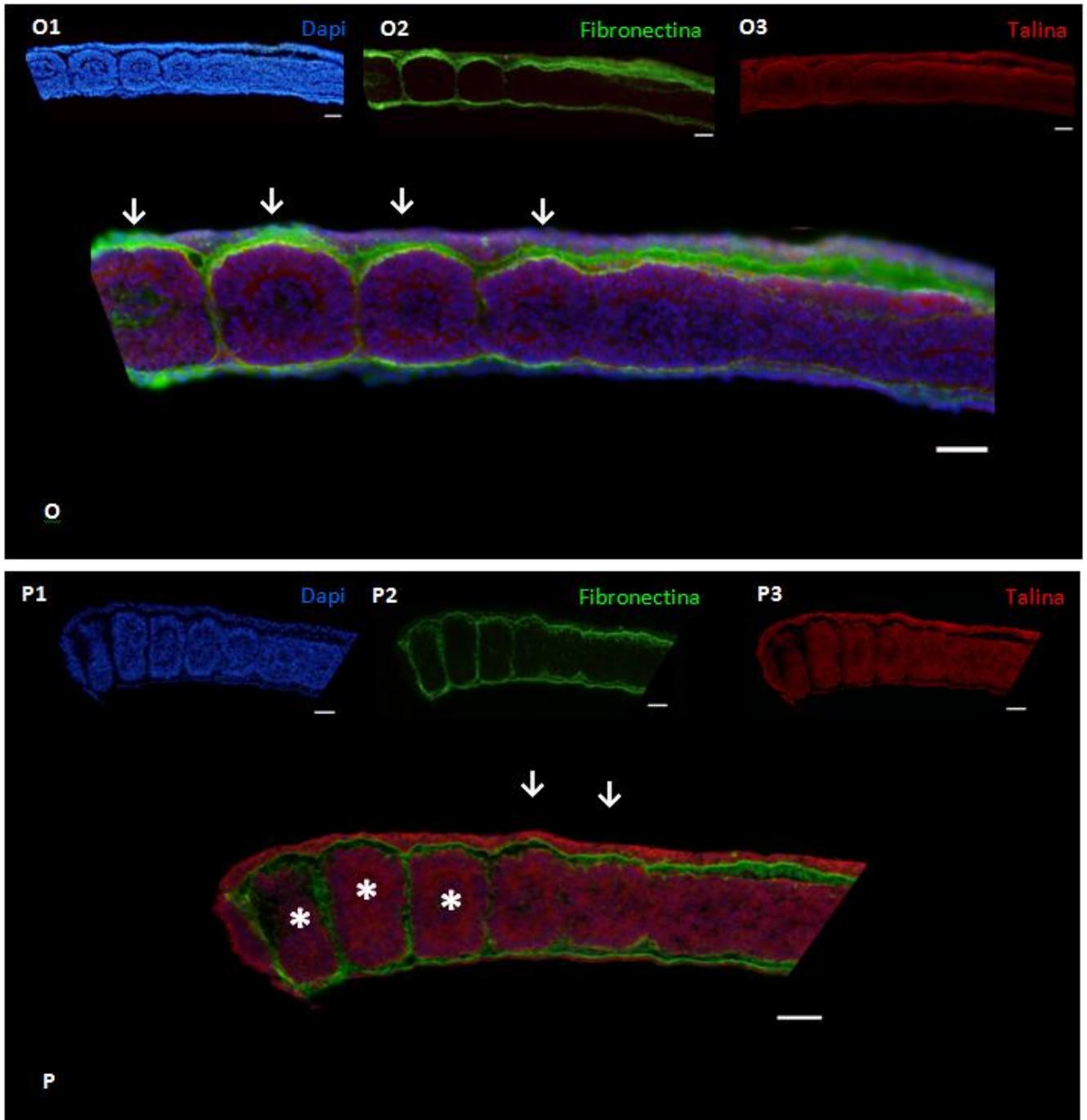
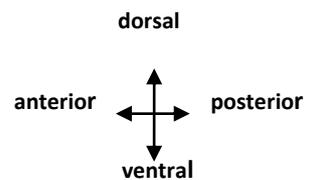


Fig.12 – Distribuição da fibronectina e talina em secções longitudinais de explantes posteriores de embriões de galinha com quatro sómitos cultivados em meio de cultura com BSA (O) e fragmento 70 kDa (P) durante 6 horas.

(O) Formaram-se 4 sómitos durante o tempo da cultura (setas brancas). A distribuição de talina nos novos sómitos formados seguiu a mesma distribuição dos sómitos já existentes, localizando-se na zona apical das células que rodeiam os somitocélios. A fibronectina também manteve a sua distribuição, rodeando todos os sómitos. **(N)** Durante as 6 horas de cultura, formou-se apenas um sómito completo, havendo início da formação de um segundo novo sómito. (setas brancas) A distribuição da talina sofreu alteração, a sua localização central no sómito ficou destabilizada no sómito em formação e bastante dispersa na PSM adjacente. A matriz de fibronectina ficou menos compacta, não envolvendo na totalidade o novo sómito formado. As estrelas indicam os sómitos existentes antes de cada cultura. Todas as barras de escala representam 100 µm.



Talina e Vinculina

Através da análise de imagens de imunohistoquímica, foi possível observar que a talina e a vinculina têm uma distribuição semelhante entre si em todas as secções. O facto de terem funções semelhantes faz com que apareçam co-localizadas uma com a outra. (fig.3) Ao nível da endoderme, ectoderme, mesoderme lateral, mesonefros, tubo neural, notocorda e PSM é visível a presença destas proteínas nas células constituintes destes tecidos em toda a membrana celular (fig. 6 e 7) . A talina e a vinculina fazem parte de um complexo de ligação das integrinas ao citoesqueleto, dessa forma seria de esperar que a sua localização fosse basal. No entanto, segundo Vasioukhin et al. 2001 a vinculina também faz parte do grupo de proteínas encarregadas de estabelecer a ligação entre o citoesqueleto e as caderinas, sendo que isso explica o facto de se localizar também na zona apical das células. No entanto, apesar de não estar documentada a existência da talina neste segundo complexo, segundo a análise destes resultados ela apresenta-se também na porção apical das células. No sómito, a talina e a vinculina encontram-se dispostas na parte apical das células epitelióides que rodeiam o somitocélio (zona central do sómito constituído por células mesenquimatosas). Estas células epitelióides apresentam características de epitélio, como seja a existência de junções de adesão, pelo que se espera a existência da vinculina nesta zona (fig.6B e 7E). A localização da vinculina e talina no dermamiótomo e esclerótomo é muito semelhante, sendo bem visível na porção apical das células do dermamiótomo, co-localizando-se com o citoesqueleto de actina, segundo dados não publicados deste laboratório. Isto prende-se com o facto de a ligação destas moléculas ser feita ao citoesqueleto, pelo que será de esperar que exista uma co-localização das mesmas com os filamentos de actina. No esclerótomo estas proteínas apresentam uma distribuição mais difusa (fig. 6A e 7D).

Paxilina

A paxilina também faz parte do complexo de ligação das integrinas ao citoesqueleto. Pela análise destas imagens, podemos concluir que se encontra em todos os epitélios, nomeadamente endoderme, ectoderme e mesoderme lateral, nas células epiteliais assumindo nestas uma posição basal. É também visível a sua presença na parte apical das células que rodeiam a aorta, o tubo neural e a notocorda. Ao nível da PSM, esta molécula encontra-se ausente. As células que constituem a PSM são células mesenquimatosas, e por isso não apresentam zonas características de células epiteliais (fig.8F). No sómito, esta proteína está presente na zona central do mesmo, ao nível da parte apical das células que rodeiam o somitocélio. Estas células têm características epiteliais, apresentando por isso junções de adesão . (fig. 8G)

ZO-1

A ZO-1 (*zonula occludens 1*), proteína constituinte fundamental das zonas oclusivas entre células epiteliais, apresenta uma distribuição pontilhada na porção apical das células epiteliais, sendo bem visível ao nível da ectoderme, endoderme, mesoderme lateral e notocorda. Ao nível do tubo neural, a presença de ZO-1 está bem representada na zona apical das células que o constituem. Esta molécula está ausente nos mesonefros e PSM (fig. 9K). No sómito, encontramos ZO-1 na parte apical das células que rodeiam o somitocélio (fig. 9J). Estas células epitelióides apresentam

características de epitélio como seja a existência de zonas oclusivas. Numa parte mais anterior do embrião, ZO-1 encontra-se bem visível na fronteira entre o dermamiótomo e o miótomo, ou seja, na parte apical das membranas laterais das células epiteliais do dermamiótomo, estando ausente no esclerótomo (fig. 9I).

Fibronectina

A fibronectina encontra-se ajacente à endoderme e à ectoderme, encontrando-se na primeira sob a forma de pequenos pontos bem evidentes. Esta distribuição relaciona-se com o facto de esta molécula ser produzida na ectoderme (Rifes P. et al. 2007). Envolve o tubo neural, notocorda e mesonefros. Na PSM, a sua presença é muito pouco significativa, aumentando conforme a progressão no desenvolvimento do sómito. Isto relaciona-se com o facto de que, ao longo da formação dos sómitos as células se vão tornando epiteliais, desenvolvendo-se sobre uma matriz extracelular contendo fibronectina. Assim, existe em maior quantidade no sómito zero (estrutura transitória entre PSM e formação de um novo sómito) relativamente à PSM. O sómito maduro encontra-se totalmente envolvido por esta molécula (fig. 6B e 7B). A importância da fibronectina na formação dos sómitos foi reforçada por estudos desenvolvidos por esta equipa, tendo sido comprovada a necessidade da existência de uma matriz forte desta molécula para que a somitogénese seja possível. Assim, a matriz de fibronectina tem como função englobar as células que formarão o novo sómito, ajudando a manter as fendas entre os sómitos já formados. Ao nível do dermamiótomo/miótomo a fibronectina parece envolver firmemente estas estruturas, enquanto no esclerótomo se encontra muito difusa e pouco densa. A matriz de fibronectina, assume-se assim, como uma fronteira entre tecidos, servindo de suporte a tecidos epiteliais como sejam o dermamiótomo, tubo neural e notocorda (fig. 6A e 7A).

AKT

A presença de AKT, de uma forma geral, é mais notória ao nível da zona posterior do embrião, especialmente ao nível do Nó de Hensen, relativamente a zonas anteriores. As suas funções estão associadas à migração, proliferação e inibição da apoptose celular (Fayard, E. et al 2005). Desta forma, nesta zona do embrião a manutenção destes processos é fundamental para a ingressão das células pelo Nó de Hensen, acontecimento que é acompanhado pela proliferação das mesmas. Nas células adjacentes ao Nó de Hensen, a proteína AKT localiza-se especificamente em células em divisão, ao nível citoplasmático e nuclear (figura 10 L3). Na ectoderme, endoderme e mesoderme lateral, a sua presença é pontual e pouco significativa. Ao longo do tubo neural, encontra-se associada a células cujos núcleos estão mais próximos do lúmen. A divisão das células no tubo neural é antecedida por uma migração do núcleo celular inicialmente localizado na porção basal da célula para perto do lúmen, onde sofre depois divisão, regressando posteriormente ao local de origem. A presença de AKT na notocorda apresenta-se difusa. Ao nível da PSM, a sua presença é bastante significativa e muito dispersa (fig. 5M). No dermamiótomo, AKT encontra-se ausente, enquanto no esclerótomo está presente mas em pequena quantidade (fig.10L).

Perturbação da matriz de Fibronectina

Para tentar perceber a influência da matriz de fibronectina na localização das proteínas em estudo, foi utilizado um fragmento de 70kDa que impede a fibrilogénese da fibronectina (McKeownlongo et al. 1985). Como controlo, foi utilizada albumina de soro bovino, uma proteína com peso molecular semelhante ao fragmento. Em todos os explantes controlo cultivados 6 horas, houve formação de quatro novos sómitos, o número de sómitos suposto visto que o tempo de formação de cada sómito são 90 minutos (fig. 11M e 12O). Nos explantes cultivados com fragmento 70 KDa (100 µg/mL) houve formação de apenas um a dois novos sómitos (fig. 11N e 12P). Isto deve-se à perturbação da fibrilogénese da fibronectina que ocorre devido à presença do fragmento na cultura, que é incorporado pelos tecidos causando o efeito referido. A produção de fibronectina não é afectada, mas como as moléculas de fibronectina se tornam incapazes de se ligarem faz com que a matriz formada não seja coesa e capaz de desempenhar as suas funções, nomeadamente participar na formação de sómitos morfológicos (Rifes P. et al 2007).

Assim, a fibronectina nos explantes cultivados com o fragmento apresenta-se mais dispersa nas zonas adjacentes à ectoderme e à endoderme, não envolvendo os sómitos formados durante a cultura, o que faz com que apesar de a informação molecular indicar a estas células que estas deverão formar um novo sómito, isto não acontece devido à incapacidade desta matriz envolver os sómitos, definindo fronteiras entre os mesmos, entre outras funções. Nos explantes cultivados com BSA, a matriz de fibronectina apresenta-se mais organizada e complexa envolvendo os novos sómitos, uma vez que a ligação das moléculas de fibronectina não é afectada, não havendo interferência na formação correcta da matriz (fig. 11N e 12P).

ZO-1

Como foi descrito anteriormente, ao nível dos sómitos, a ZO-1 localiza-se na porção apical das células que rodeiam o somitocélio, endoderme e ectoderme, enquanto ao nível da PSM esta molécula não é detectável. Esta localização é confirmada pela análise das secções sagitais dos explantes cultivados com BSA, onde a localização de ZO-1 se mantém a mesma (fig. 11M).

Nos explantes cultivados com o fragmento 70 kDa, o somitocélio aumenta o seu diâmetro comparativamente com o somitocélio de explantes cultivados com BSA. (fig. 11N) Este fenómeno acontece devido ao facto de a inibição da fibrilogénese da fibronectina dificultar a formação do epitélio do sómito (Martins G. et al., 2009).

Na PSM adjacente ao último sómito formado, a qual deveria ter formado sómitos no tempo em que decorreu a cultura, ZO-1 está presente embora de forma muito difusa, sendo mais evidente a sua presença na PSM mais madura, constituindo um início de organização em volta do somitocélio presuntivo (fig. 11N). Isto poderá acontecer devido ao facto de a fibronectina ser necessária para polarizar as células e reforçar a adesão célula a célula, como seja a formação de zonas de oclusão. No entanto a inibição da fibrilogénese da fibronectina impede que este fenómeno ocorra completamente. Este acontecimento foi descrito recentemente para a N-caderina por esta mesma equipa (Martins G. et al 2009).

Na ectoderme e endoderme a disposição de ZO-1 não é alterada nas células visto que a matriz de fibronectina adjacente a estes dois folhetos mantém o seu padrão de distribuição.

Talina

Os efeitos da actuação do fragmento mantiveram-se nos explantes experimentais onde se analisou o padrão de distribuição da talina: houve aumento do diâmetro dos somitocélios comparativamente com os explantes controlo, e a matriz de fibronectina apresentou-se novamente dispersa (fig. 12P).

A talina também manteve a sua localização, de acordo com aquela que foi descrita anteriormente, nos cortes sagitais dos explantes controlo (fig. 12O). Nos explantes experimentais a distribuição da talina revelou-se mais difusa.

Na PSM adjacente, onde se deveriam ter formado mais sómitos, é visível que a distribuição desta proteína se encontra mais dispersa do que nos explantes controlo. Desta forma, podemos inferir que os efeitos da acção do péptido também influenciam a distribuição desta molécula. No entanto, ao nível da endoderme e da ectoderme a distribuição da talina manteve-se, pelas razões já descritas.

De forma geral, podemos concluir que a influência da matriz de fibronectina poderá ser alargada a muitas outras moléculas. O papel desta molécula na somitogénese verifica-se não só a nível morfológico como a nível molecular, podendo estar relacionado com muitos outros processos que continuam desconhecidos.

Considerações finais

Os objectivos inicialmente propostos foram cumpridos e perfeitamente conciliados com os meus deveres académicos. O projecto que desenvolvi complementou os conhecimentos que adquiri nas aulas no sentido em que se revelou uma aplicação prática dos mesmos, especialmente nas disciplinas de Embriologia e Histologia e Biologia do Desenvolvimento Animal. Este projecto permitiu-me desenvolver as minhas competências pessoais, alargando o meu conhecimento na área da Biologia do Desenvolvimento, ajudando-me a fazer opções mais sólidas no futuro.

No entanto, os conhecimentos que adquiri não se restringiram aos objectivos a que me propus inicialmente. A interacção com outras problemáticas despertou-me para outras questões relacionadas com esta área da Biologia. Percebi o que está por detrás do bom funcionamento de um laboratório, e a necessidade de interacção e partilha de conhecimentos entre as pessoas que nele trabalham.

O projecto enquadrou-se perfeitamente na linha de investigação seguida pelo Laboratório de acolhimento, tendo-se revelado importante para o trabalho que está a ser desenvolvido actualmente colmatando uma lacuna ainda existente relativamente ao padrão de distribuição de algumas moléculas nestas estruturas embrionárias estudadas neste grupo: a PSM, os sómitos e o dermamiótomo, no embrião de galinha.

A apresentação pública deste trabalho será feita através de um vídeo. Em anexo segue o histórico de disciplinas.

Agradecimentos

Agradeço à minha tutora, Professora Gabriela Rodrigues, pela orientação e empenho que dedicou a este projecto e pelo conhecimento que me transmitiu. Agradeço à Professora Sólveig, pela disponibilidade que demonstrou, tendo-se revelado uma ajuda preciosa, ao Professor Gabriel pelo apoio ao nível da microscopia e em alguns problemas técnicos que foram surgindo. Agradeço ao Pedro Rifés, à Raquel Vaz, ao Tomás Azevedo, à Ana Gaspar, à Ana Lina e ao Luís Marques pela paciência revelada no ensino de procedimentos técnicos específicos e pelo esclarecimento de questões que foram surgindo. Agradeço a todos a partilha de informação e de experiências pessoais/profissionais e sobretudo o bom ambiente de trabalho que proporcionaram.

Referências Bibliográficas

- Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A. e Olson, E. N.** (1996). Requirement of the *paraxis* gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* **384**, 570-573.
- Fayard, E. Tintignac, L.A. Baudry, A. Hemmings, B.A.** (2005) Protein kinase B/Akt at a glance, *J. Cell Sci.* **118**, 5675-5678.
- Gilbert, S.** (2006) *Developmental Biology*, 8ª edição, Sinauer Associate, Inc., Massachusetts
- Gossler, A. e Hrabe de Angelis, M.** (1998), Somitogenesis, *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**, 25-287.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* **195**, 231-272.
- Junqueira, L.C. Carneiro J.** (2008), *Histologia Básica*, 11ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Lodish, H. Berk, A. Matsudaira, P. Kaiser, C. Krieger, M. Scott, M. Zipursky, S. Darnell, J.** (2003) *Molecular cell Biology*, 1ª edição, W.H Freeman and Company, Nova Iorque
- Martins, G. Rifés, P. Amândio, R. Rodrigues, G. Palmeirim, I. e Thorsteinsdóttir, S.** (2009) Dynamic 3D Cell Rearrangements Guided by a Fibronectin Matrix Underlie Somitogenesis, *Aceite*.
- McKeown-Longo, P. J. e Mosher, D. F.** (1985). Interaction of the 70,000-molwt amino-terminal fragment of fibronectin with the matrix-assembly receptor of fibroblasts. *J. Cell Biol.* **100**, 364-374.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. e Pourquié, O.** (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **91**, 639-648.
- Pankov, R. e Yamada, K. M.** (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**, 3861-3863.
- Rifés, P. Carvalho, L. Lopes, C. Andrade, R.P., Rodrigues, G., Palmeirim, I. e Thorsteinsdóttir S.** (2007) Redefining the role of ectoderm in somitogenesis: a player in the formation of the fibronectin matrix of presomitic mesoderm, *Development* **134**, 3155-3165
- Vasioukhin, V. e Fuchs, E.** (2001) Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia, *Current opinion in cell biology* **13**, 76-84

Lisboa, 31 de Julho de 2009

(Ana Isabel de Melo Bernardo)

(Maria Gabriela Rodrigues)