

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**Função de Proteoglicanos de Condroitina
na Morfogénese da Mesoderme**

Magnus Stefan dos Santos Val-Flores

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2007 / 2008

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**Função de Proteoglicanos de Condroitina
na Morfogénese da Mesoderme**

Magnus Stefan dos Santos Val-Flores

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Dissertação orientada por
Prof.^a Doutora Sólveig Thorsteinsdóttir

2007 / 2008

Índice

Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
<i>Morfogénese da mesoderme</i>	7
<i>Matriz Extracelular na embriogénese e morfogénese</i>	9
<i>Algumas funções dos HSPG durante o desenvolvimento</i>	10
<i>Algumas funções dos CSPG durante o desenvolvimento</i>	12
<i>Objectivos e abordagem experimental da presente tese</i>	15
Material & Métodos	16
Resultados	20
<i>Distribuição geral de KSPG, HA e perlecan no embrião de galinha de estado HH17</i>	20
<i>Distribuição de proteoglicanos de condroitinasulfato no embrião de estado HH12-14</i>	22
<i>Explantes cultivados em meio contendo condroitinase ABC</i>	27
Discussão	33
<i>Os proteoglicanos são uma presença universal na matriz extracelular desempenhando papéis morfogénicos em pontos específicos onde possuem acumulação diferencial</i>	33
<i>CSPGs: proteoglicanos incontornáveis...</i>	35
<i>CSPGs são responsáveis pelo afastamento das massas celulares e a formação de espaço</i>	36
<i>Consequências da eliminação de CSPGs</i>	37

Agradecimentos

À minha orientadora, prof^a Sólveig Thorsteinsdóttir, pela paciência, simpatia, sabedoria e humildade com que aturou as minhas inaptidões, falhas, teimosias e atrasos, e pelo facto de me ter acolhido como mestrando “fora de horas”, sem qualquer projecto, nem ideia de o que fazer. Não é para todos.

À prof^a Maria Manuela Coelho por simpaticamente me ter aturado durante meses sempre a pedir informações sobre prazos, disciplinas, equivalências e afins e, principalmente, por ter tratado todo o meu processo de forma a tornar viável este mestrado nas condições em que foi feito.

Ao Doutor Gabriel Martins pela boa disposição, valorosos conselhos técnicos de microscopia, tratamento de imagens, quantificações e reconstruções a 3D e por dizer mal do *Windows Vista*.

À prof^a Gabriela Rodrigues pelos conhecimentos, conselhos e sugestões muito relevantes e úteis.

Ao Pedro Rifés pelas “aulas” de laboratório em que aprendi a mexer-me em laboratório além de inúmeras técnicas aperfeiçoadas pelo *perfeccionista* de serviço.

À Ana Gaspar pela preciosa ajuda nos cortes de criostato, por me ter feito imensas imunofluorescências, pelos muitos cigarros que me deu, mas principalmente pela alegria *não convencional* que trouxe ao ambiente de trabalho.

Ao António Temudo pelo companheirismo nas noitadas de trabalho, por aturar-me a dizer mal da vida, e por estar mais atrasado do que eu na escrita da tese.

Ao Luís Marques pela boa disposição e humor que trazia ao grupo.

À Rita Amândio por me ter ensinado várias técnicas para colher embriões com 24hrs de incubação, por ter a tese escrita há imenso tempo e nunca a entregar, por responder às baboseiras e provocações que lhe fazem e por ser o alvo preferencial quando alguém critica os *Mac's*..

Ao novo *grupo BD*, Tomás, Raquel e Ana Lina por serem os novos *maçaricos* fazendo-me parecer um tipo sábio e experiente apesar de continuar a ser uma nulidade.

À Catarina Lopes por alguns conselhos úteis de laboratório.

A Carla por maltratar os peixinhos e por fazer algo diferente que não tenha nada a ver com embriões.

Finalmente e principalmente à minha mulher e aos meus filhos por me terem permitido e apoiado a realizar este meu *capricho* contra todas as probabilidades e *bom senso* e por aceitarem a minha falta de apoio em casa e as minhas longas horas de ausência.

Resumo

A morfogénese da mesoderme inicia-se com a regionalização das células que ingressaram na gastrulação formando-se a mesoderme lateral, a intermédia, a paraxial e a axial. A morfogénese está relacionada com fenómenos de epitelização e desepitelização.

A matriz extracelular, além de suportar as células, regula todo o seu comportamento (crescimento, proliferação, migração, etc). Fazem parte desta matriz colagénios, fibronectina, laminina, proteoglicanos entre outros. A função primária dos proteoglicanos é a de hidratar a matriz podendo, no entanto, servir de barreira ou guia na migração de células ou proporcionar sinais parácrinos e funcionar como co-sinalizadores.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a distribuição de alguns destes proteoglicanos durante a morfogénese da mesoderme. Pela sua distribuição nos espaços que separam as camadas germinativas e os diferentes tecidos mesodérmicos, foi estudada a função dos proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG). Para isto fez-se cultura de explantes posteriores de embriões de galinha em meio de cultura contendo condroitinase. Sem CSPGs: (1) os espaços que separam os tecidos não se formam ficando estes justapostos; (2) a matriz de fibronectina não se forma convenientemente nem em quantidade nem em qualidade; (3) a polarização das células epiteliais é deficiente; (4) devido à polarização deficiente os sómitos e a notocorda perdem a sua forma original esférica ou cilíndrica; (4) os somitos epiteliais perdem a sua estabilidade chegando nalguns casos a fundir; e (5) os primórdios vasculares não se formam por falta de fendas somíticas.

Estes resultados levaram-nos a concluir que os CSPGs e os espaços criados por eles têm a função de: (1) regionalizar a mesoderme; (2) permitir a formação de matriz extracelular capaz de orientar e polarizar as células em estruturas epiteliais; (3) manter a estabilidade das estruturas epiteliais por formar barreiras anti-migração e (4) proporcionar espaço para a construção de novas estruturas celulares.

Palavras Chave: Proteoglicanos, CSPG, morfogénese, mesoderme, galinha

Abstract

Morphogenesis of mesoderm starts with the regionalization of mesodermal cells that ingress through the process of gastrulation and their organization into lateral, intermediate, paraxial and axial mesoderm.

The extracellular matrix is known to give structural support to cells within an organism, but also controls cell behavior (growth, proliferation, migration etc). It is composed of collagens, fibronectin, laminin, proteoglycans among others. The primary function of proteoglycans is to hydrate the extracellular matrix, but they can also serve as migration guides or barriers and bind paracrine factors, sometimes even function as co-signaling agents.

In the present work, the distribution of some proteoglycans during the morphogenesis of mesoderm was studied. Because of its prominent presence in the space that separates the different germ layers and the different mesodermal regions, the role of chondroitin sulphate proteoglycans was studied in some detail. Explants of caudal halves of chick embryos were cultured in the presence of chondroitinase. Without CSPGs: (1) the spaces that separate the embryonic tissues do not form and these tissues come into close apposition; (2) the fibronectin matrix does not assemble normally, neither in quality nor in quantity; (3) epithelial cells do not polarize properly; (4) epithelial somites are abnormal and sometimes fuse; and (5) vascular primordia do not form due to the lack of somitic clefts.

These results lead us to conclude that CSPGs and the spaces they create play a role in: (1) mesoderm regionalization; (2) permitting the assembly of an extracellular matrix able to orient and polarize cells into epithelial structures; (3) stabilising epithelial structure and forming anti-migration barriers and (4) creating space to allow the development of new cellular structures.

Key words: Proteoglycans, CSPG, morphogenesis, mesoderm, chicken

Introdução

Morfogénese da mesoderme

A mesoderme surge com o processo de gastrulação quando, por transformação epitélio-mesênquima (EMT), as células do nó de Hensen e da linha primitiva ingressam para o interior do embrião, ficando entre a ectoderme e a endoderme. Pouco depois, dá-se a neurulação ao mesmo tempo que a mesoderme regionaliza-se em massas celulares que se destacam: a mesoderme lateral, a intermédia, a paraxial e a axial. Esta separação está muitas vezes associada a fenómenos de epitelização como por exemplo a mesoderme lateral ou mesmo a notocorda, outras após epitelizar voltam e desepitelizar, como o caso dos sómitos quando formam esclerótomo {Lash, 1957 #216}. Esta regionalização da mesoderme é essencial para que os processos embrionários seguintes se dêem.

Neste trabalho vamos concentrar-nos mais sobre a somitogénese como modelo de morfogénese na mesoderme.

Somitogénese

A mesoderme, exceptuando a da cabeça, divide-se em quatro zonas: axial (notocorda), paraxial (mesoderme pré-somítica e sómitos), intermédia e lateral. Os sómitos resultam da divisão da mesoderme pré-somítica (PSM) constituindo o padrão de segmentação dos vertebrados. Formam-se aos pares por epitelização da porção anterior da PSM, que se destaca em cada um dos lados. Esta somitogénese prossegue ao longo do embrião em direcção à zona posterior. Ao mesmo tempo prossegue, na zona posterior, a gastrulação, adicionando mais células mesenquimatosas, formando-se, conseqüentemente mais mesoderme, isto é, o embrião cresce em comprimento. Disto resulta também uma diferença de desenvolvimento (em gradiente) entre a zona anterior - mais desenvolvida - e a zona posterior - mais primitiva. Cada par de sómitos formados são duas esferas de epitélio cilíndrico com uma cavidade central - somitocélio - contendo células mesenquimatosas. Os sómitos após a sua formação impõem um padrão segmentar nos nervos periféricos e nos primórdios vasculares e, mais tarde, os derivados dos sómitos originam a musculatura esquelética e o esqueleto axial {Christ, 1995 #63} {Gossler, 1998 #76}.

Na passada década o processo indutor e regulador da somitogénese tem vindo a ser progressivamente desenhado, apesar de estar longe de ser acabado. Há assim dois processos distintos: a segmentação molecular da parte anterior da PSM e a segmentação morfológica do sómito, isto é, a separação e epitelização do sómito na ponta anterior da PSM.

Genes e processos envolvidos na segmentação molecular da PSM

Antes de ocorrer a segmentação morfológica ocorre a segmentação molecular do terço anterior da PSM assim como é definida a sua polaridade Anterior-Posterior (A-P) (Palmeirim et al. 1998). O terço anterior da PSM têm um ambiente parácrino diferente do restante PSM e a fronteira entre estas duas regiões denomina-se a frente de determinação {Dubrulle, 2001 #72}. A segmentação molecular é conseguida através da acção do factor de transcrição Mesp2 e da sinalização Delta/Notch {Saga, 1997 #142} {Takahashi, 2000 #141}. Mesp2 delimita os futuros sómitos anteriormente {Morimoto, 2005 #140}, reprime a expressão de Dll1 e induz a expressão de Lunatic fringe (Lfg) que inibe a actividade de Notch {Morimoto, 2005 #140}. Temos assim, no futuro compartimento anterior do sómito, expressão de Mesp2 e Lfg e, no futuro compartimento posterior, expressão de Dll1 e Notch. Mesp2 assegura deste modo a segregação da expressão génica entre os futuros compartimentos anterior e posterior do sómito. A manutenção da polaridade A-P no sómito recém-formado é conseguida através dos factores de transcrição Tbx18 e Uncx4.1 {Mansouri, 2000 #145} {Bussen, 2004 #146} (figura 1).

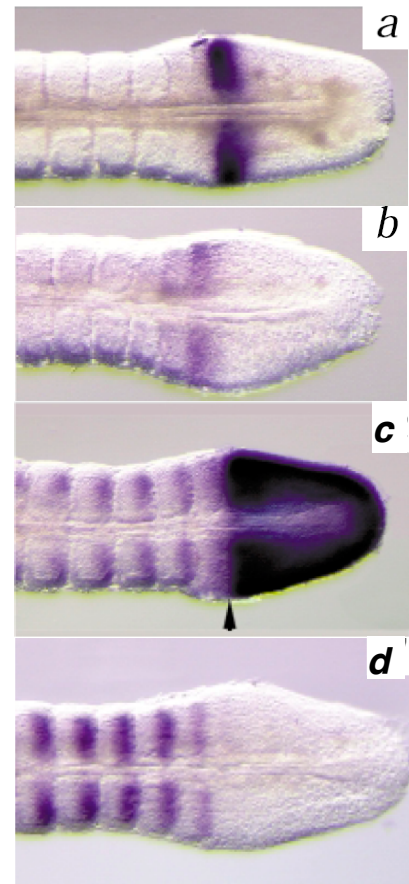


Figura 1 - Expressão (hibridização *in situ*) de alguns genes na psm e nos sómitos de rato relevantes na segmentação molecular da psm e na compartimentação molecular do sómito. a-Mesp2, b-Notch2, c-Dll1, d-Uncx4.1. {Takahashi, 2000 #141}

Genes e processos envolvidos na segmentação e epiteliação do sómito (segmentação morfológica)

Para que o sómito epitelial se forme é necessária a conjugação de uma série de factores como a adesão célula-célula através de caderinas e a existência de uma matriz extracelular (ECM) propícia a este processo. Algumas proteínas chave envolvidos neste processo são Paraxis {Burgess, 1996 #136}, Papc (protocaderina) {Burgess, 1996 #136} {Rhee, 2003 #137} {Linker, 2005 #82}, a fibronectina {Georges-Labouesse, 1996 #135} {Rifes, 2007 #64} e proteínas das famílias de Eph/Efrina e de caderina {Kalcheim, 2005 #139}.

Mutantes para o gene que codifica a fibronectina, *Fnl1*, não formam sómitos epiteliais {Georges-Labouesse, 1996 #135} e o principal papel da ectoderme na somitogénese é fornecer fibronectina {Rifes, 2007 #64} e não o de enviar um suposto sinal parácrino indutor da somitogénese, como anteriormente tinha sido proposto {Borycki, 1998 #149} {Borycki, 2000 #148} {Correia, 2000 #207} {Schmidt, 2004 #99}, sendo pois necessária uma matriz intacta de

fibronectina para que os sómitos se formem {Rifes, 2007 #64} (figura 2). Mutantes para Paraxis, apesar de não formarem sómitos epiteliais, sofrem segmentação da PSM, mostrando que estes processos são, até certo ponto, independentes {Burgess, 1996 #136}.

Matriz Extracelular na embriogénese e morfogénese

A matriz extracelular (ECM) de uma forma geral, além de suportar as células, regula a reorganização dos tecidos, o crescimento celular, a expressão génica, a multiplicação e a diferenciação celular em resposta a factores de crescimento solúveis mas também em resposta a estímulos mecânicos {Ingber, 2002 #217}. Fazem parte desta matriz colagénios, fibronectina, laminina, proteoglicanos entre outros. Neste trabalho iremos focar-nos nos proteoglicanos.

Proteoglicanos

Proteoglicanos (PG) são um grupo de moléculas constituídas por uma proteína central (*core protein*) e glicosaminoglicano(s) (GAG) covalentemente ligado(s) a esta.

Os GAG, sintetizados no complexo de Golgi, são polímeros de dissacarídeos. Um dos açúcares dos resíduos dos dissacarídeos é um ácido urónico (ácido D-glucorónico ou ácido L-ilurónico) e o outro N-acetilglicoseamina ou N-acetilgalactoseamina. Cada dissacarídeo possui pelo menos um grupo aniónico (grupo carboxilo, sulfato ou hidróxido), o que faz com que a molécula final tenha muitas cargas negativas e sendo portanto muito hidrófila, servindo para hidratar a ECM. São exemplos de GAG condroitinosulfato (CS) ($n \leq 250$), dermatanosulfato (DS) ($n \leq 250$), heparanosulfato (HS) ($n = 200$), heparina (forma hipersulfatada de HS), queratanosulfato (KS) ($20 < n < 40$) e hialurona / ácido hialurónico (HA) ($n \leq 25.000$) (não sulfatado, mas com muitos grupos carboxilo) {Lamoureux, 2007 #218}.

Os PGs podem então ser classificados de acordo com o seu GAG predominante. Tem-se assim heparanosulfato proteoglicanos (HSPG), condroitinosulfato proteoglicanos (CSPG), dermatanosulfato proteoglicanos (DSPG) e queratanosulfato proteoglicanos (KSPG). De modo semelhante, subclassifica-se cada grupo de PG de acordo com a sua proteína central {Lamoureux, 2007 #218}.

Por exemplo, dentro dos HSPG, tem-se o perlecan, a agrina e o colagénio de tipo XVIII, como PGs da ECM e syndecan e glypican como PGs da superfície celular. Perlecan é o principal PG da lâmina basal; liga componentes da ECM uns aos outros e liga moléculas da superfície celular à ECM. PGs da superfície celular ancoram as células à ECM e ligam-se a moléculas sinalizadoras ajudando na regulação e função celular {Lamoureux, 2007 #218} {Esko, 2001 #118}.

O peso molecular e densidade de cargas de uma população de PGs pode apenas ser expressa em médias uma vez que: o tamanho da proteína central é variável, o número de GAGs associadas é variável (de a um ou poucos a mais de cem) e o tipo de GAG associados pode não ser só um (por exemplo syndecan possui HS e CS associados).

As famílias de PGs

A função primária atribuída aos PG da ECM é o de a hidratar, *i.e.* é a sua capacidade higroscópica de proporcionar um meio hídrico estável que envolve as células e preenche o espaço ocupado pela ECM. No entanto, na última década têm sido desvendadas novas funções mais *ativas* para estes compostos nomeadamente como co-sinalizadores.

As três famílias de HSPGs: glypicans e syndecans - da superfície celular - e perlecan - HSPGs segregados distribuídos pela ECM – são todas elas evolutivamente conservadas quer em invertebrados (como *Drosophila* e *C. elegans*) quer em vertebrados, havendo uma grande homologia entre os genes que as produzem {Lin, 2004 #113}.

Existem quatro famílias de CSPGs: aggrecan, versican, neurocan e brevican. São os principais e mais abundantes PG do sistema nervoso central (SNC) tendo importantes funções no desenvolvimento e funcionamento deste sistema {Li, 2000 #104} {Schwartz, 2004 #165}. Existem no entanto outros PGs no SNC.

KSPGs são conhecidos pela sua importância no desenvolvimento da córnea {Funderburgh, 1986 #219} {Gealy, 2007 #221} e pela sua participação na formação dos grandes agregados de proteoglicanos com ácido hialurónico e CSPGs principalmente na cartilagem, como por exemplo nas articulações {Craig, 1987 #223}. Estão também associados ao sistema circulatório estando presente na aorta {Funderburgh, 1991 #222}. No organismo final temos, por exemplo, KSPGs como principal PG segregado pelas células epiteliais do útero {Carson, 1988 #224}.

DSPGs, com o próprio nome indica, estão geralmente associados a formações dérmicas e epidérmicas como sejam a própria derme, as gengivas e os dentes {Larjava, 1988 #225}, embora possam aparecer em estruturas como a retina {Morris, 1987 #226}.

Em termos de função durante o desenvolvimento embrionário, sabe-se mais sobre as funções de HSPGs e CSPGs.

Algumas funções dos HSPG durante o desenvolvimento

Mutações em enzimas relacionadas com a via de síntese das HSPGs provocam efeitos semelhantes àquelas dos mutantes das próprias proteínas sinalizadoras, indicando, no mínimo, que

estes PGs têm um efeito modulador sobre estes processos de sinalização. Isto foi verificado com membros das famílias Wnt/Wg, Hh, TGF β e FGF ({Lin, 2004 #113} {Princivalle, 2002 #154}). Pegando no exemplo da via de sinalização Wnt/Wg, tem sido demonstrado que HSPGs são essenciais na sinalização da via Wnt. Por exemplo, a proteína glypican é essencial para a sinalização via Wnt durante a gastrulação, em peixe zebra {Topczewski, 2001 #152} e no anfíbio *Xenopus laevis* {Ohkawara, 2003 #153}. Outro exemplo é o papel das sulfatases na sinalização Wnt. Esta enzima remove grupos sulfato das cadeias de HS. Parece assim contraditório que esta enzima promova a sinalização Wnt uma vez que enfraquece a ligação das proteínas Wnt ao HS. Uma sugestão é que a enzima altere o HS, facilitando a formação de complexos Wnt-HSPG capazes de promover a ligação de Wnt a receptores frizzled iniciando-se assim a transdução do sinal Wnt.

Há assim dois modelos propostos para a função dos HSPGs na via Wnt. O primeiro (modelo quantitativo) assenta no pressuposto de que os HSPGs aumentam a concentração local do sinal quer porque estabiliza a proteína sinalizadora e/ou porque reduz a dimensionalidade da difusão para uma situação bidimensional uma vez que mantém o sinal sobre a membrana {Hacker, 1997 #158} {Pfeiffer, 2002 #159}. Isto é apoiado pelo facto de que, se aumentarmos a concentração do sinal, em mutantes para a via de síntese de HSPGs, se consegue recuperar, pelo menos parcialmente, dos efeitos da mutação. {Hacker, 1997 #158}.

O segundo modelo (modelo qualitativo) propõe que os HSPGs actuam como co-receptores do sinal na formação dos complexos sinal-receptor, havendo uma elevada especificidade nas sequências da cadeia de HS a que se liga o sinal {Lin, 1999 #160}. De qualquer modo os dois modelos não se excluem mutuamente podendo os HSPGs ter os dois papéis na distribuição e recepção do sinal {Han, 2004 #161}.

Os dois modelos não se aplicam apenas à via de sinalização Wnt/Wg havendo exemplos para Hh {Stark, 1998 #164} {Perrimon, 2000 #111} e para FGFs, aqui o HSPG podendo actuar induzindo ou estabilizando a dimerização de FGF {Lin, 1999 #160} {Ornitz, 2000 #162} {Pellegrini, 2000 #163}.

Nestas vias de distribuição ou co-sinalização o estado de sulfatação pode ser relevante, e a expressão de enzimas como as sulfatases pode decidir se o sinal é transmitido/distribuído ou não. Por exemplo, HS-endosulfatases em rato (MSulfs) são referidos como repressores da sinalização por FGF2 em células satélite activadas e, deste modo, controlam se as células vão proliferar ou diferenciar-se {Langsdorf, 2007 #103}.

Estão frequentemente a ser descobertas vias de sinalização em que GAGs são essenciais para que a sinalização se dê. Por exemplo, foi recentemente reportado que, para que o factor parácrino Nodal (pertencente à família TGF β), que desempenha um papel preponderante na formação de assimetria esquerda-direita, chegue do nó de Hensen até à mesoderme lateral, é essencial a presença de GAGs sulfatados, neste caso CS {Oki, 2007 #105}

Algumas funções dos CSPG durante o desenvolvimento

Tal como os outros proteoglicanos os CSPGs compreendem um grupo de moléculas com bastante variabilidade intrínseca. A variabilidade dentro dos CSPGs envolve características das proteínas centrais, número e comprimento das cadeias laterais (GAGs), grau de epimerização do ácido D-glucurónico em ácido L-idurónico e o grau de sulfatação de cada uma das posições 4 e 6 da N-acetilgalactosamina {Couchman, 1984 #213}.

Embora inicialmente se pensasse que diferentes tecidos apresentavam CSPGs diferentes {Couchman, 1984 #213} e que havia proteoglicanos específicos de cada um desses tecidos, actualmente os dados apontam para que cada tecido apresente conjuntos diferentes de CSPGs mas não havendo CSPGs absolutamente específicos de nenhum tecido. Por exemplo, neurocan CSPG era considerado específico do sistema nervoso e está presente no coração e vasos sanguíneos durante o desenvolvimento {Mishima, 2003 #214}. Do mesmo modo agrecan era considerado específico da cartilagem e é agora descrito no cérebro {Krueger, 1992 #215} e no coração {Zanin, 1999 #209}.

CSPGs formam barreiras anti-migração

Os CSPGs da ECM têm, desde há muito tempo, sido considerados como moléculas anti-adesão, tanto na inibição da adesão célula-célula como na inibição célula-matriz. Embora se soubesse que estas propriedades anti-adesivas só existiam com o proteoglicano inteiro (os GAGs *sozinhos* não possuem esta capacidade) {Knox, 1979 #228}, pensava-se que esta “capacidade” advinha apenas do facto delas taparem as moléculas adesivas impedindo-as de contactarem {Knox, 1979 #228} {Rich, 1981 #229} {Yamagata, 1989 #230}. No entanto, estudos posteriores revelaram que esta anti-adesão pelos CSPGs é mediada por receptores específicos. Quando CSPGs se ligam a estes receptores, as células são impedidas de se espalharem, impedindo-as de se ligarem a substratos adesivos como por exemplo a fibronectina que promove o afastamento e migração celulares {Ernst, 1995 #231}. Os CSPGs, além de impedir que as células se espalhem, consequentemente também impedem que as células migrem {Funderburgh, 1986 #219} {Tan, 1987

#232} {Perris, 1990 #233}, estando presentes em *barreiras anti-migração celular* {Crossin, 1989 #234} {Oakley, 1994 #235} {Landolt, 1995 #236}. Por exemplo neurocan inibe adesão por ligar-se a

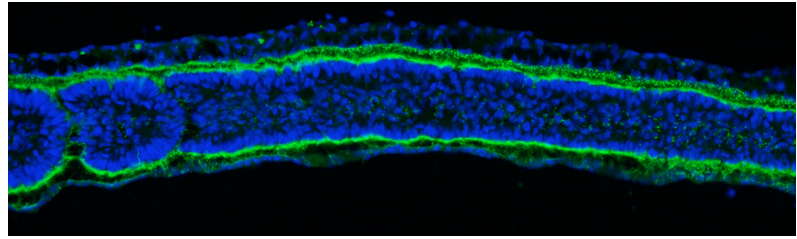


Figura 2 - Corte sagital da parte posterior de um embrião de galinha exibindo psm e sômito 0. Marcado imunohistoquimicamente para fibronectina(verde) e DNA(azul). {Rifes, 2007 #64}.

NCAM {Friedlander, 1994 #237}, ou por activar a descolagem de integrinas- β 1 e N-caderina do citoesqueleto {Li, 2000 #104}, impedindo-as de funcionarem como moléculas adesivas.

CSPGs guiam migrações celulares

A gastrulação parece um bom exemplo da função *clássica* dos CSPGs na embriogénese primária. CSPGs estão presentes em toda a lâmina basal do epiblasto, sendo determinantes para impedir a ingressão destas células {Canning, 2000 #238}. Com a gastrulação, na linha primitiva, os CSPGs desaparecem permitindo a desepitelização e ingressão das células e a sua transformação em células mesenquimatosas (*epithelial–mesenchymal transformation (EMT)*). Quando se fornece CSPGs à linha primitiva, a ingressão é inibida, assim quando os CSPG são removidos enzimaticamente em outros pontos da lâmina basal do epiblasto provoca-se a formação de novas *linhas primitivas* {Canning, 2000 #238}. Por outro lado a ausência ou decréscimo de CSPGs na lâmina basal epiblastica impede ou afecta o movimento das células do epiblasto (epibolia) quer antes da gastrulação quer durante a própria gastrulação em si {Canning, 2000 #238}. Isto ilustra as duas facetas dos CSPGs na migração celular: por um lado impedem o movimento de células individuais, uma vez que não se deixam atravessar, funcionando como uma barreira anti-migração naquela direcção {Crossin, 1989 #234} {Oakley, 1994 #235} {Landolt, 1995 #236} mas por outro lado funcionam como suporte à migração de camadas celulares sobre aquela superfície.

CSPGs participam no controlo da proliferação, diferenciação e adesão celulares.

Como seria de esperar, os CSPGs estão envolvidos no desenvolvimento das estruturas e tecido cartilágneo e ósseo (condrogénese) {Kimata, 1986 #239}, sendo fulcrais mesmo no tecido cartilágneo final, como por exemplo nos discos intervertebrais {Melrose, 2008 #240}.

Têm funções morfogenéticas, nomeadamente na neurulação, na migração das células da crista neural e do esclerótomo {Morriss-Kay, 1989 #241} e na fusão das pregas neurais cefálicas {Alonso, 2008 #244}.

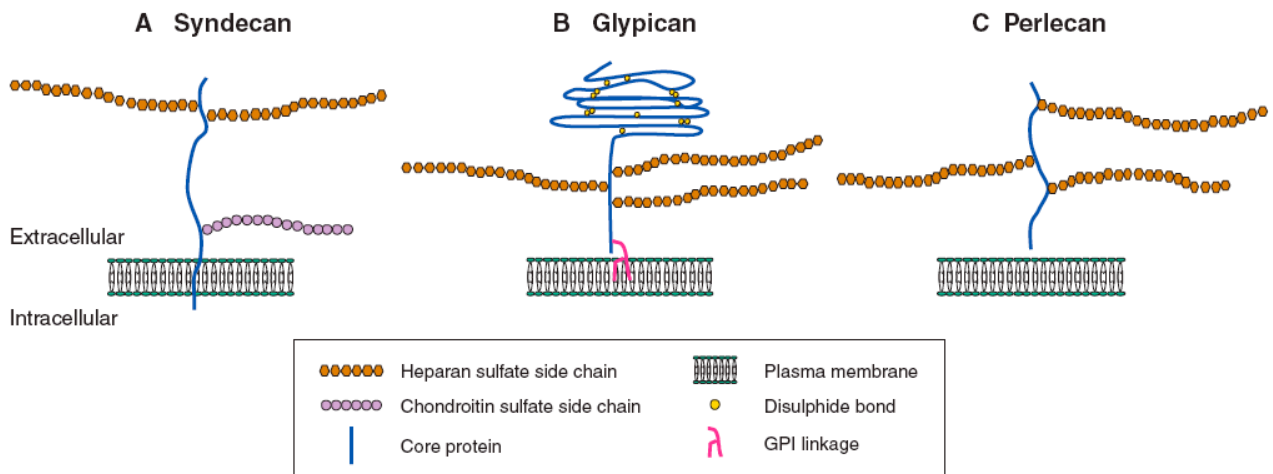


Figura 2 - Estrutura dos principais HSPGs da superfície celular .{Lin, 2004 #113}.

Na migração das células da crista neural {Tan, 1987 #232} {Moro Balbas, 1998 #243} {Perris, 1990 #233} {Morris-Kay, 1989 #241} {Perris, 1997 #242} {Perissinotto, 2000 #185} CSPGs funcionam como *guias* para a migração destas células. Por exemplo, adição de CSPGs na *rota migratória* funciona como barreira total, impedindo a migração destas células que acabam por penetrar no neurocélio {Moro Balbas, 1998 #243} mas uma distribuição apropriada de versican e agrecan (duplamente exclusiva) guia a sua migração {Perissinotto, 2000 #185}.

A segregação diferencial de diferentes CSPGs durante a morfogénese do SNC está envolvida na formação das linhagens celulares {Domowicz, 2000 #245}, *i.e.* regulam a proliferação de células estaminais neurais e decidem a linhagem que estas células irão adoptar: neuronal ou glial {Sirko, 2007 #246}.

No desenvolvimento cardíaco e vascular CSPGs parecem ter um papel preponderante. Versican, agrecan e neurocan PGs estão presentes nas paredes das artérias interagindo com HA formando grandes agregados {Doege, 1987 #247}, {Ernst, 1995 #231} com principal incidência para versican {Wight, 2002 #248}. As propriedades higroscópicas destes agregados faz com que formam estruturas moleculares capazes de resistir à compressão pelo fluxo sanguíneo {Wight, 1997 #249}.

CSPGs estão presentes no espaço que forma a geleia cardíaca (*cardiac jelly*) {Kitten, 1987 #250} havendo uma grande microheterogeneidade na sua distribuição no interior desta geleia. Estão envolvidas na transformação epitélio-mesênquima (EMT) de células do endocárdio e na formação do *endocardial cushion tissue*, o tecido precursor das válvulas cardíacas {Capehart, 1999 #251}, {Zanin, 1999 #252}, {Mishima, 2003 #253} {Arciniegas, 2004 #130}. A secreção de CSPGs específicos proporciona às células mesenquimatosas cardíacas, uma vez formadas por EMT, movimento celular direccionado e sustentado mas também inibe o movimento da população celular

como um todo {Funderburgh, 1986 #219}. Algo semelhante se passa nos vasos sanguíneos em que por exemplo neurocan funciona como barreira/guia que regula os padrões de formação destes vasos {Mishima, 2003 #253}.

Objetivos e abordagem experimental da presente tese

Neste trabalho pretendeu-se estudar a função dos proteoglicanos na morfogênese da mesoderme em geral e na somitogênese em particular. Para isso tornou-se necessário estudar a distribuição geral dos diversos grupos de proteoglicanos e comparar esses resultados com algumas funções já conhecidas de alguns deles e depois escolher aquele(s) que parecessem *prometedores*. Os CSPGs apresentam-se distribuídos de forma *interessante* para este caso, preenchendo os espaços envolventes das estruturas mesodérmicas parecendo bons candidatos a funções importantes nesta morfogênese. Para testar estas possíveis funções optou-se por centrar na parte posterior onde a regionalização da mesoderme se inicia e também onde ocorre a somitogênese, processo esse em que se desconhece ainda as funções dos proteoglicanos e fazer cultura de explantes dessa parte posterior reduzindo ou eliminando enzimaticamente os CSPGs.

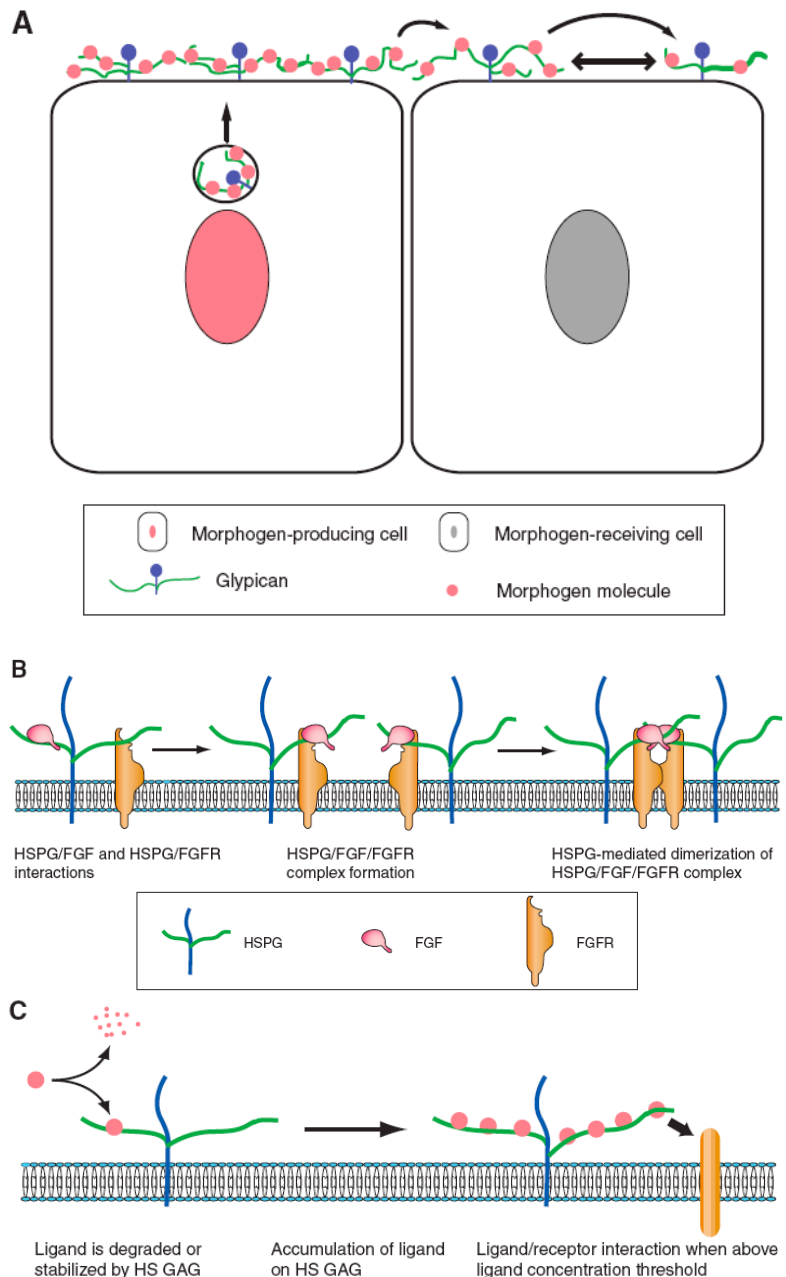


Figura 3 - Modelos para a função dos HSPGs na transmissão de fatores parácrinos. A: transmissão entre célula produtora do sinal e a receptora via PGs da superfície mantem factores sobre a superfície das células reduzindo a dimensionalidade da difusão. B: modelo em que os PGs funcionam como co-sinalizadores sendo necessários para que a transdução do sinal se dê. C: modelo em que o PG aumenta a estabilidade e a concentração do sinal na superfície celular que de outro modo se degradaria rapidamente. {Lin, 2004 #113}.

Material & Métodos

incubação e colheita de embriões

Ovos de galinha (*Gallus gallus*) fecundados foram incubados por 48 ou 72 horas a 37-38°C em ambiente humedecido até estádios entre HH12-14 ou HH17-18 (Hamburger 1951), respectivamente.

Embriões foram colhidos em PBS (*phosphate buffered saline*) sem Ca^{2+} nem Mg^{2+} e fixados a 4°C durante pelo menos 12h em 4% paraformaldeído em PBS, se para imunofluorescência *in toto*, ou 0,2% paraformaldeído com 4% sacarose em PBS, se para cortes de criostato; ou colhidos em PBS completo (com Ca^{2+} e Mg^{2+}) a temperatura ambiente se para cultura de explantes.

Nomenclatura para estados embrionários segue {Hamburger, 1992 #65}. Nomenclatura para sómitos segue {Christ, 1995 #63}.

cultura e manipulação de explantes in vitro

Após colhidos e lavados em PBS completo, o embriões de estádios HH12-14, eram dispostos com a parte ventral voltada para cima e fixos ao substrato com pontas de tungsténio com o objectivo de rasgar a endoderme numa linha paralela à notocorda, sobre a linha entre tubo neural e mesoderme paraxial desde o sómito II até os 2/3 anteriores da PSM utilizando uma agulha de tungsténio afiada electroliticamente. Isto era apenas efectuado na metade direita do embrião, servindo a metade esquerda como controlo para este procedimento em particular. O objectivo desta abertura, apesar de se saber que ela voltará a fechar durante a cultura, é garantir a entrada da enzima uma vez que é de tamanho considerável (120kDa (Martinez 1959)). Tanto embriões experimentais como controlos sofreram este procedimento. Uma vez concluído, os embriões eram voltados revelando a sua face dorsal, voltados a prender sobre o fundo negro, para se determinar o estado e cortados transversalmente após o sómito IV, *i.e.*, produzindo explantes de toda a parte caudal até ao sómito IV {Christ, 1995 #63}.

Segue-se a montagem dos explantes sobre filtros de 0,8µm flutuando sobre o meio de cultura M199+GlutaMAX™ (Gibco) com 10% soro de galinha (Gibco), 5% soro fetal bovino dializado (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina 5000U (Gibco) (de acordo com Palmeirim 1997, Rifes 2007), contendo 0,2U/ml de condroitinase ABC de *Proteus vulgaris* (Sigma) activa para os experimentais ou inactivada pelo calor (30 minutos a 65°C) para os controlos. Em todas as culturas foram usados tantos experimentais como controlos estando estes intercalados nos poços das placas de cultura.

Todos os processos anteriores foram efectuados no interior da câmara de fluxo laminar (Interlab) para garantir esterilidade.

Logo após os explantes montados, as placas eram transferidas para a estufa de incubação a 37°C e 5%CO₂ e cultivados por 9 horas (o tempo necessário para formar 6 novos sómitos), sendo depois lavados momentaneamente em PBS e fixados de acordo como o protocolo pretendido.

cortes de criostato

Embriões inteiros ou explantes, após fixados, foram lavados em 4% sacarose em PBS a 4°C 12 horas ou mais e depois desidratados em 15% sacarose em PBS a 4°C 12 horas ou mais. Foram depois incluídos numa solução de 7,5% gelatina e 15% sacarose em PBS a 37°C por 1 hora. Depois de solidificado a temperatura ambiente, e depois de devidamente aparados, os embriões ou explantes foram transferidos para pequenas caixas de papel de alumínio e colocados em isopentano arrefecido em gelo seco até congelarem totalmente. Foram depois mantidos a -80°C durante pelo menos 12 horas até serem usados (Bajanca, et al., 2004).

Para microscopia de epifluorescência (Olympus BX-60), foram efectuados cortes de criostato (Bright Clinicut) transversais e sagitais com 12µm de espessura aos embriões de estados HH12-14 e cortes transversais de 18µm aos embriões de estados HH17-18. Os cortes foram colocados sobre lâminas Superfrost Ultra Plus® (Thermo Scientific).

Para microscopia confocal foram feitos cortes sagitais de 30µm sobre o mesmo tipo de lâminas.

Alguns embriões foram incluídos directamente (após fixados e lavados em PBS) em Tissue-Tek® (O.C.T.™), congelados e efectuados cortes de criostato sagitais de 30µm para microscopia confocal.

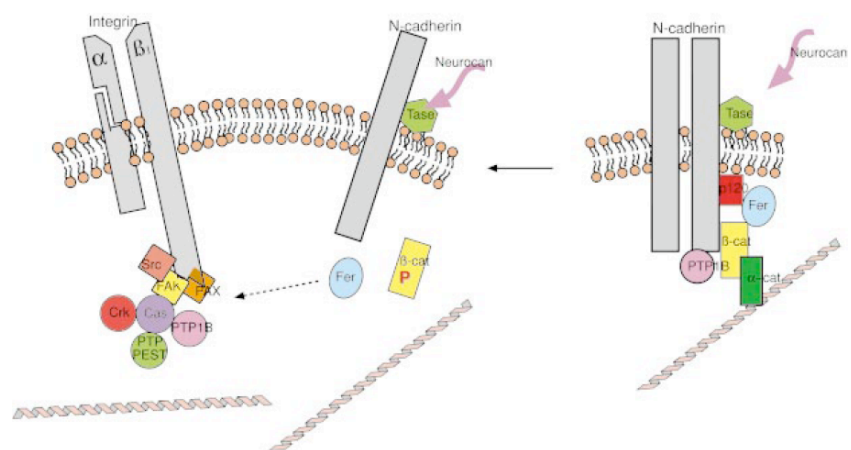


Figura 4 - Representação da interacção de neurocan sobre os complexos integrina-caderina. Sem neurocan o complexo é funcional e mantém ligado ao citoesqueleto. Na presença de neurocan o complexo desagrega e a célula perde a sua adesividade. {Li, 2000 #104}

imunofluorescência

Para cortes de criostato, após secarem ao ar por alguns minutos, as lâminas foram rehidratadas em PBS 2 x 5 minutos, permeabilizados em 0,2% Triton X-100 em PBS por 20

minutos, lavadas em PBS 3 x 10 minutos e bloqueados com NGS (*normal goat serum*) 1:10 e 1% BSA em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se incubação com anticorpo(s) primário(s) diluído(s) numa solução de 1% BSA em PBS a 4°C 12 horas ou mais. Após lavadas em PBS 3 x 10 minutos, foram incubadas em anticorpo(s) secundário(s) diluído em 1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem em PBS 3 x 10 minutos e pós-fixação em 0,2% paraformaldeído em PBS por 1 hora e novamente lavadas em PBS. Por fim foi usado VectaShield® (Vector Laboratories) como meio de montagem, selado com verniz e observado (preferencialmente de seguida) e/ou guardado a 4°C no escuro. Alguns cortes eram reservados a funcionar como controlo, não tendo incubado com qualquer anticorpo primário (apenas 1% BSA em PBS), para detectar marcação inespecífica ou interacção dos anticorpos secundários.

Para imunofluorescência *in toto*, após fixados os embriões ou explantes foram lavados em PBS 3 x 20 minutos e incubados com anticorpos primários diluídos em ID (1 % BSA e 1 % Triton X-100 em PBS) 12 horas ou mais a 4°C. Após lavagens de 3 x 20 minutos em PBS, foram incubados com anticorpos secundários e ToPro3 (marcador nuclear) 12 horas ou mais a 4°C. Após lavados 3 x 20 minutos em PBS foram pós-fixados em 0,2% paraformaldeído em PBS por 2 horas a temperatura ambiente ou a 4°C 12 horas ou mais. De seguida procedeu-se a uma desidratação lenta em metanol numa série de 20 passos (Gabriel G. Martins, protocolo não publicado), *i.e.*, com incrementos de 5% na concentração de metanol em cada passo de 10 em 10 minutos, usando soluções diluídas e adicionadas gota a gota, uma vez que os embriões de galinha são muito sensíveis à desidratação, em especial os explantes, e principalmente se foram manipulados. Após lavados em 100% metanol 2 x 5 minutos, eram guardados a -20°C no escuro para utilização posterior ou procedia-se de imediato à transparentização para observação imediata.

Antes de montar para observar procedeu-se à transparentização progressiva (em 3 ou 4 passos; Gabriel G. Martins, protocolo não publicado) por substituição do metanol por metilsalicilato. Após lavados em metilsalicilato 100% eram montados em 100% metilsalicilato e selados com parafina fundida a 70°C.

anticorpos

Anticorpos primários usados:

- anti-epítomos carbohidratados de CS (rato), clone 9BA12 (Ring 1995), (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)) diluído 1:50
- anti-CS-A e CS-C (rato), clone CS-56 (Avnur 1984), (Sigma) diluído 1:100
- anti-epítomos sulfatados de KS (rato), clone I22 (Funderburg 1982), (DSHB) diluído 1:50

- anticorpo que se liga a um proteoglicano (condrosarcoma PG) na parte que se liga ao ácido hialurónico (rato), clone 12/21/1-C-6 (Caterson 1986), (DSHB) diluído 1:50
- anti-domínio IV de perlecan (rato), clone 5C9 (Halfter 1993), (DSHB) diluído 1:50
- anti-fibronectina (coelho) (Sigma) diluído 1:400
- anti-N-caderina (rato) (BD) diluído 1:100
- anti- β -catenina (coelho) (Santa Cruz) diluído 1:200.

Anticorpos secundários usados:

- anti-rato IgG F(ab')₂; Alexa 568 (Molecular Probes) diluído 1:1000
- anti-coelho IgG F(ab')₂; Alexa 488 (Molecular Probes) diluído 1:1000
- anti-rato IgG F(ab')₂; Alexa 488 (Molecular Probes) diluído 1:1000
- anti-coelho IgG F(ab')₂; Alexa 546 (Molecular Probes) diluído 1:1000

Outros marcadores usados:

- marcador nuclear, To-Pro3 (Molecular Probes) diluído 1:500, com RNase diluído 1:100.

microscopia, registo e análise de imagens

Após a cultura, os explantes eram observados à lupa binocular (Leica MZ125), feita uma contagem preliminar dos sómitos e, nalguns casos fotografados com uma câmara acoplada (Leica DCF320 CCD Color Camera).

A preparação de cortes de criostato para efeitos de observação de epifluorescência foram observados num microscópio Olympus BX60 equipado com epifluorescência e óptica de Nomarski e as imagens captadas por uma câmara digital (DP-50) acoplada, captando imagens com 2776 por 2074 píxeis (6MP).

As preparações de cortes, embriões inteiros ou explante inteiros preparados para microscopia confocal eram observados num microscópio laser confocal de varrimento Leica SP2. Imagens simples para informação bidimensional, ou planos empilhados (*stack's*) para informação tridimensional, foram captados originando imagens/planos com 1024 por 1024 píxeis.

Imagens foram analisadas e tratadas usando software ImageJ e Amira® 4.1. Quantificações de intensidade de imunofluorescência bidimensionais (sobre cortes) foram recolhidas usando ImageJ. Quantificações de intensidade de imunofluorescência tridimensionais, cálculo de volumes e reconstruções a 3 dimensões foram obtidos usando Amira® 4.1.

Resultados

Foram determinadas e estudadas as distribuições de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, nomeadamente proteoglicanos de queratanosulfato (KSPG), ácido hialurónico (HA), perlecan (um proteoglicano de heparanosulfato (HSPG)) e proteoglicanos de condroitinasulfato (CSPG)), durante o desenvolvimento do embrião de galinha (HH12-HH18).

Distribuição geral de KSPG, HA e perlecan no embrião de galinha de estado HH17

KSPG

KSPG tem uma presença mais ou menos universal na matriz do embrião desta fase. No entanto notam-se zonas na matriz com diferentes graus de imunoreactividade.

Há uma forte imunoreactividade ao nível da ectoderme (figura 5:A-E), assim como por toda a matriz do tubo neural (figura 5:A,C-E). Na zona cefálica parece revestir, ainda que ligeiramente, o interior deste (figura 5:A). Está presente a nível da matriz do miocárdio mas não na geleia cardíaca nem no endocárdio (figura 5:B).

A estrutura de maior imunoreactividade ao longo de todo o eixo anterior-posterior é a matriz da notocorda (figura 5:C-E). Está também fortemente marcada a matriz do dermamiótomo e especialmente revestindo a sua face ventral (figura 5:C). Também a matriz do tubo nefrogénico está fortemente marcada, especialmente revestindo o seu interior (figura 5:C,D). De modo semelhante os sómitos possuem KSPG na sua matriz, especialmente no revestimento do somitocélio (figura 5:D). A matriz da PSM também possui KSPG mas não aparenta ter mais que qualquer outro tecido mesodérmico (figura 5:E).

A endoderme também possui uma forte imunoreactividade (figura 5:C-E). Conforme se caminha para a zona posterior parece haver um decréscimo de imunoreactividade na ectoderme e um aumento substancial a nível da endoderme, sendo nesta zona tão ou mais fortemente marcada que a notocorda (figura 5:E).

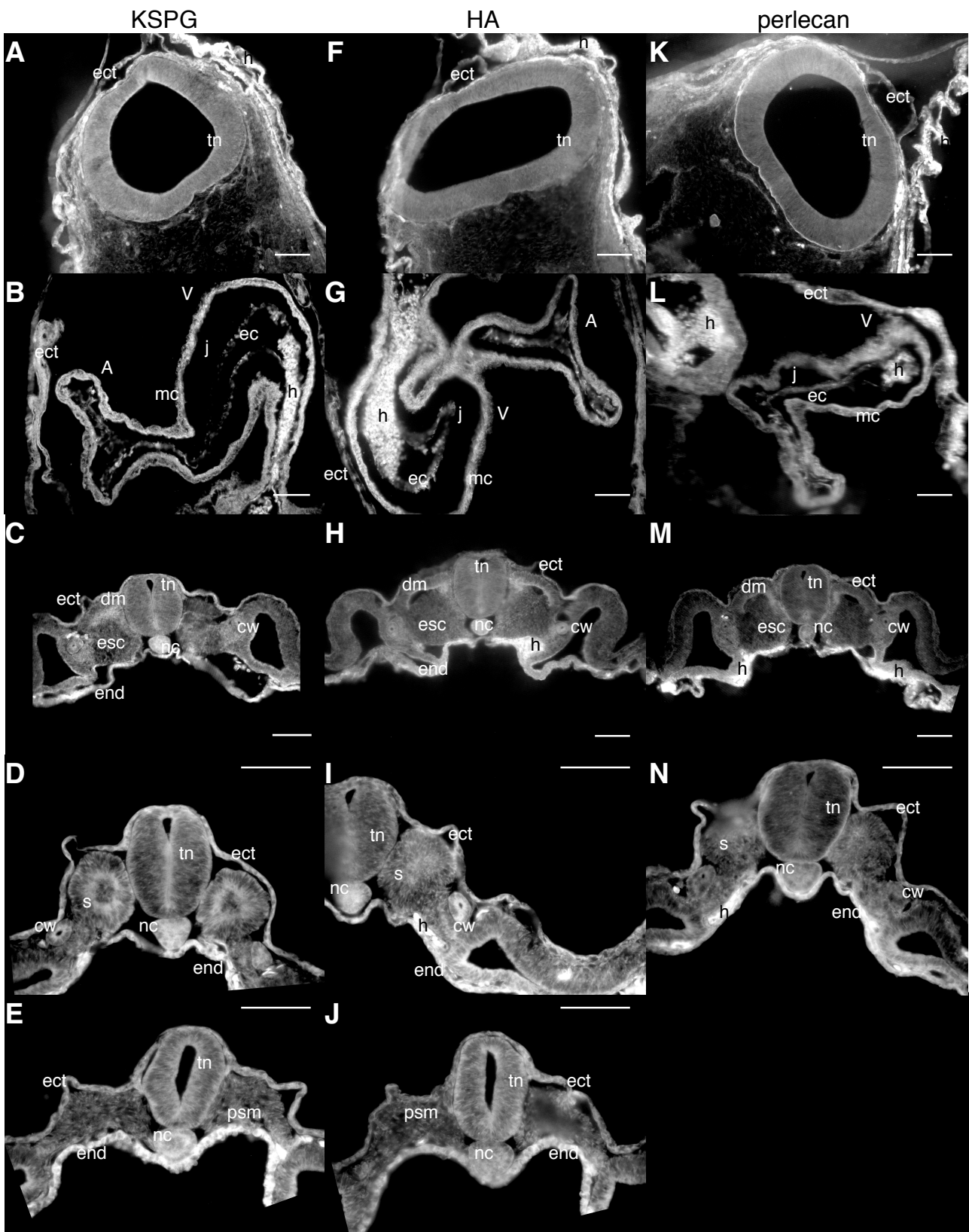


Figura R1 - cortes de criostato transversais em embriões HH17 marcados imunohistoquimicamente para sulfato de queratano (KSPG) (A-E), ácido hialurônico (HA) (F-J) e perlecan (K-N). ect-ectoderme, end-endoderme, tn-tubo neural, mc-miocárdio, ec-endocárdio, j-geleia cardíaca, A-aurícula, V-ventrículo, h-hemáceas (apresentam autofluorescência), nc-notocorda, cw-canal nefrogénico (canal de Wolff), dm-dermamiotomo, esc-esclerótomo, s-sômito, psm-mesoderme pré-somítica. Barra de escala: 100 μ m.

HA

O ácido hialurónico possui uma distribuição muito semelhante à do KSPG, provavelmente porque estes se encontram muitas vezes associados. {Lamoureux, 2007 #218}

Observamos uma forte imunoreactividade de HA na matriz da ectoderme (figura 5:F-J), do tubo neural (figura 5:F,H-J), do dermamiótomo (principalmente revestindo a sua face ventral) (figura 5:H), do tubo nefrogénico (principalmente revestindo o seu interior) (figura 5:H,I) e dos sómitos (mas não revestindo especialmente o somitocélio) (figura 5:I). Tal como no caso do KSPG a estrutura com maior imunoreactividade é a notocorda (figura 5:H-J). A nível da endoderme também observamos uma forte imunoreactividade revelando um gradiente antero-posterior ao nível da intensidade da marcação (figura 5:H-J).

No coração encontra-se HA na matriz do miocárdio (mas não na geleia cardíaca nem no endocárdio) (figura 5:G). Os tecidos mesenquimatosos mesodérmicos também estão medianamente marcados, sem distinção para a PSM (figura 5:F-J).

perlecan

Este proteoglicano, o principal das membranas basais {Lamoureux, 2007 #218}, reveste internamente a ectoderme (figura 5:K-N) e a endoderme (figura 5:M,N) e externamente o tubo neural, a notocorda e o tubo nefrogénico (figura 5:K,M,N) num padrão compatível com a localização nas membranas basais destes tecidos. Reveste, embora fracamente, externamente o sómito epitelial (figura 5:N) e dorsalmente o dermamiótomo. Há alguma imunoreactividade, embora muito fraca, em toda a matriz intersticial mesodérmica, eventualmente um pouco mais na zona cefálica.

Distribuição de proteoglicanos de condroitinasulfato no embrião de estado HH12-14

CSPG preenche os espaços que separam as camadas germinativas e as estruturas axiais do restante embrião

A distribuição de CSPG é mais ou menos ubíqua pela matriz extracelular do embrião desta fase (HH12-14) aparentando ser um componente mais ou menos universal nesta matriz, {Zagris, 2001 #114} {Skandalis, 2003 #179} (figura 6:A). Porém, podemos observar zonas em que a sua acumulação é muito mais intensa comparativamente com a presença geral intersticial. O local de mais forte imunoreactividade para CSPG é o coração, nomeadamente separando o endocárdio do

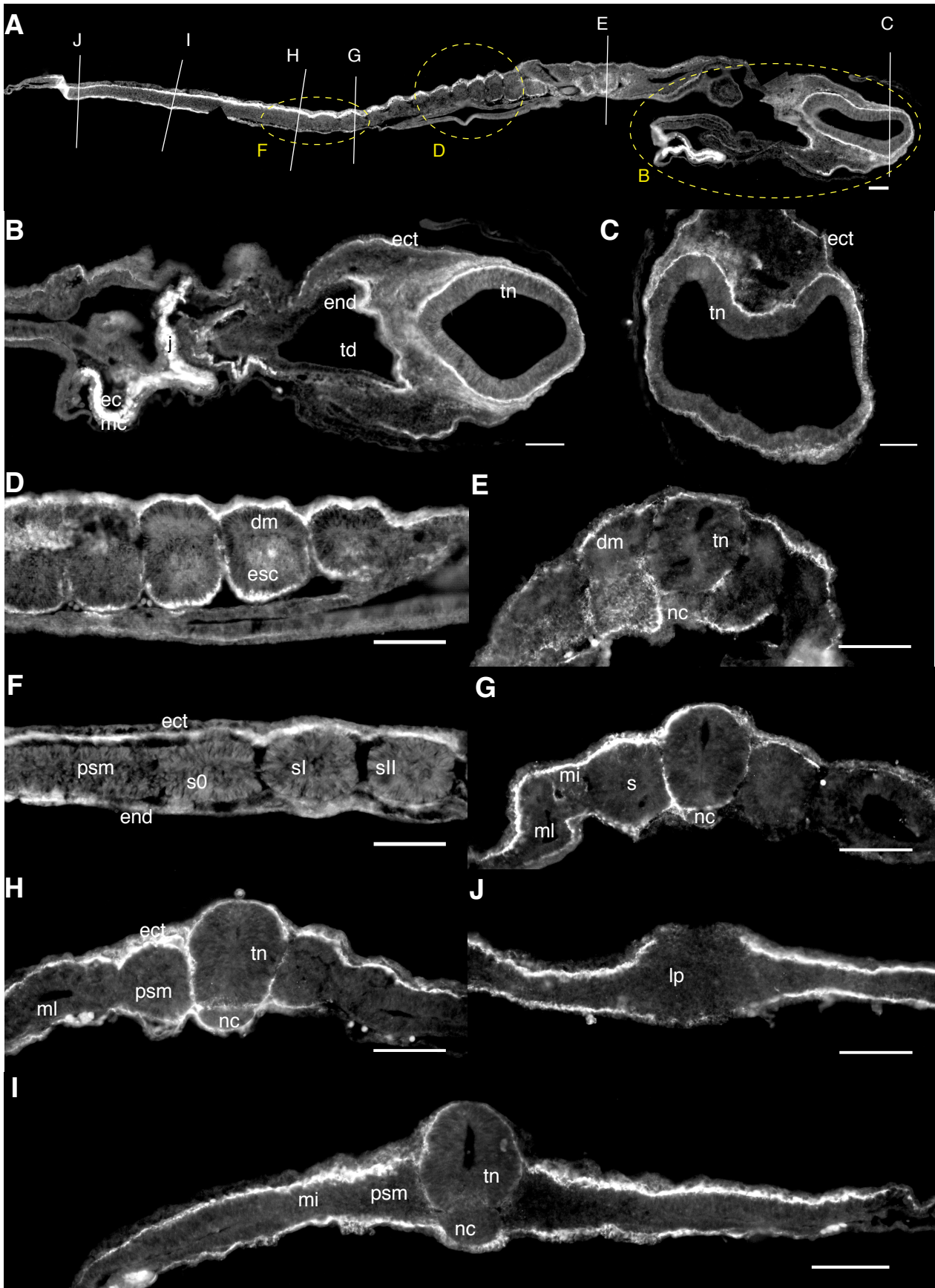


Figura R2 - Cortes de criostato mostrando a distribuição geral de CSPG detectada pelo anticorpo 9BA12, em embriões de estado HH12-13. A, B, D e F cortes sagitais. C, E, G-J cortes transversais. psm-mesoderme pré-somítica, ect-ectoderme, end-endoderme, tn-tubo neural, nc-notocorda, ml-mesoderme lateral, mi-mesoderme intermédia, lp-linha primitiva, nc-notocorda, s#-somito, esc-esclerótomo, dm-dermamiótomo, td-tubo digestivo, ec-endocárdio, j-geleia cardíaca, mc-miocárdio. Barra de escala:100µm.

miocárdio fazendo parte da geleia cardíaca (figura 6:A,B) {Zanin, 1999 #209} {Nahirney, 2003 #182}.

CSPG reveste exteriormente o tubo neural (figura 6:B,C,E,G,H,I), preenchendo o espaço que o separa das outras estruturas embrionárias. A intensidade desta imunoreactividade é maior na zona cefálica (figuras 6:B,C), parecendo haver um gradiente decrescente antero-posterior.

CSPG reveste a ectoderme basalmente, preenchendo o espaço entre a ectoderme e o tubo neural e entre a ectoderme e as estruturas mesodérmicas, incluindo a mesoderme lateral (figura 6:A-J). Neste caso o local de imunoreactividade máxima parece ser sobre a parte anterior da PSM e sobre os primeiros 2 ou 3 sómitos, decrescendo em gradiente quer na direcção anterior como na posterior (figura 6:A e figura 7:B).

De modo semelhante os CSPGs revestem a endoderme preenchendo o espaço entre esta e as estruturas mesodérmicas. Aqui parece haver um gradiente crescente conforme se caminha para a parte caudal, *i.e.*, o nó de Hensen (figura 6:A).

O preenchimento do espaço subectodérmico e sobendodérmico por CSPG estende-se para a mesoderme intermédia e por toda mesoderme lateral (figura 6:I).

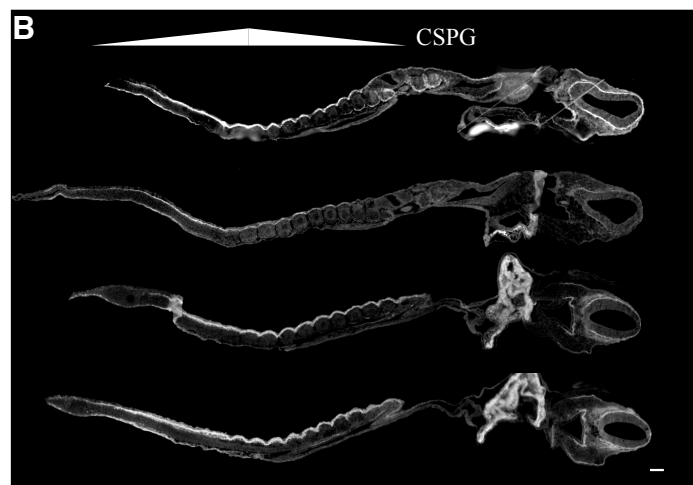
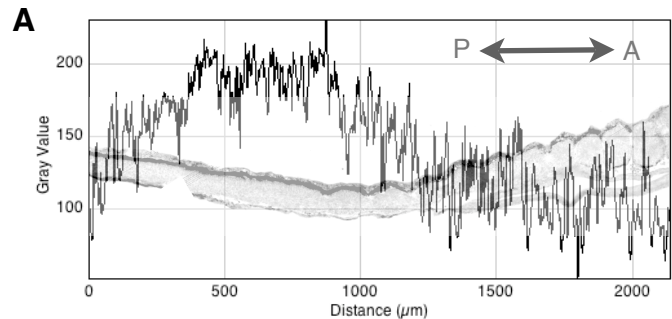


Figura R3 - Imunoreactividade para CSPG subectodérmica detectada pelo anticorpo 9BA12 ao longo do eixo A-P na zona psm+sómitos. A: Medição dos níveis de cinzento subectodérmicos do corte visível. B: Quatro cortes de criostato sagitais do mesmo embrião demonstrando o gradiente P-A-P. Barra de escala: 100µm

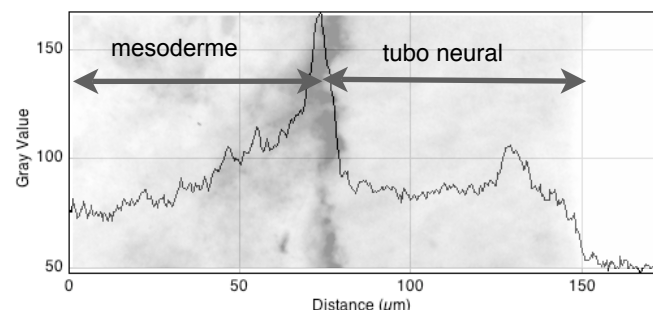


Figura R5 - Nível de CSPG na zona cefálica, no corte transversal visível no gráfico.

A intensidade intersticial de CSPG no mesênquima cefálico não é uniforme

Na zona cefálica, a nível mesodérmico, há dois gradientes simultâneos: a intensidade decresce conforme nos afastamos do tubo neural (figura 8) e decresce conforme caminhamos na direcção caudal (figura 6:A,B), sendo a zona cefálica uma das zonas em que há maior imunoreactividade intersticial.

CSPG está entre as células do esclerótomo

Outra zona de imunoreactividade intersticial muito elevada é a matriz do esclerótomo, *i.e.* preenchendo os espaços que separam estas células. Esta matriz intensa de CSPG estende-se para além dos interstícios celulares e envolve o próprio esclerótomo enquanto massa celular (figura 6:D,E).

CSPG rodeia a notocorda e os sómitos epiteliais estando presente na fenda somítica

Imunoreactividade para CSPG é evidente no espaço que rodeia a notocorda ao longo de todo o eixo antero-posterior (figuras 6:E,G,H). Os sómitos epiteliais além de possuírem CSPG na matriz intersticial do epitélio, possuem uma camada de CSPG que cobre toda a superfície do sómito. Deste modo, além de haver CSPG a separar o sómito do tubo neural, notocorda, mesoderme intermédia,

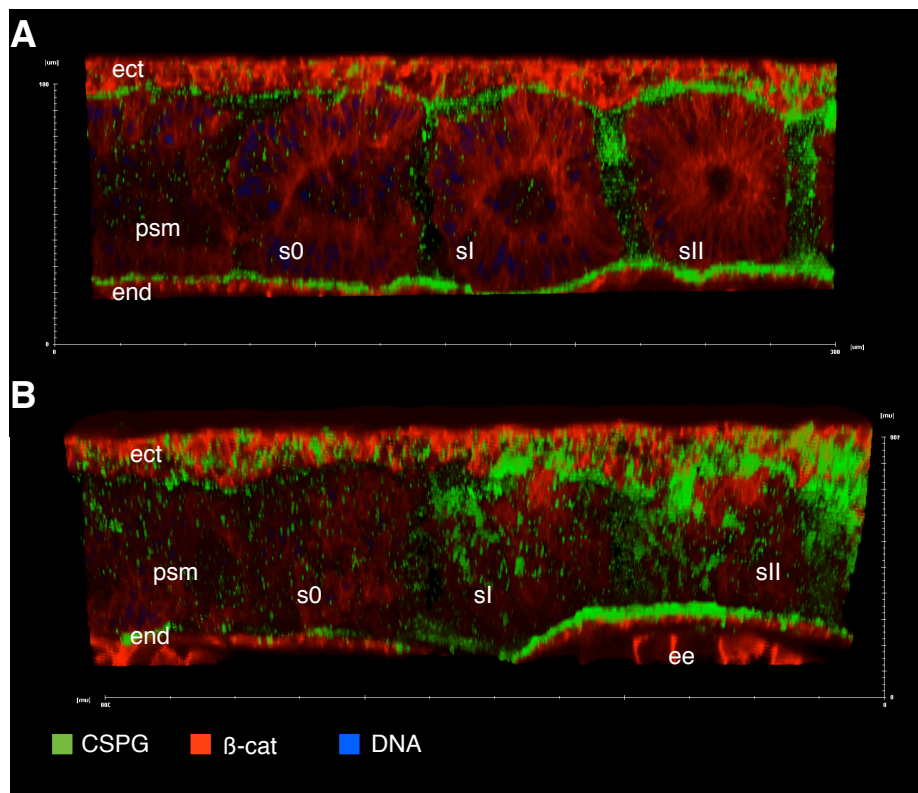


Figura R6 - Reconstrução 3D.a partir de imagens de microscopia confocal de embriões marcados para CSPG (verde) e N-caderina (vermelho). ect-ectoderme, end-endoderme, psm-mesoderme pré-somítica, s#-sómito, ee-extra-embriário. A-vista lateral num plano sagital atreessando os sómitos. B-vista lateral num plano sagital entre a mesoderme intermédia e os sómitos.

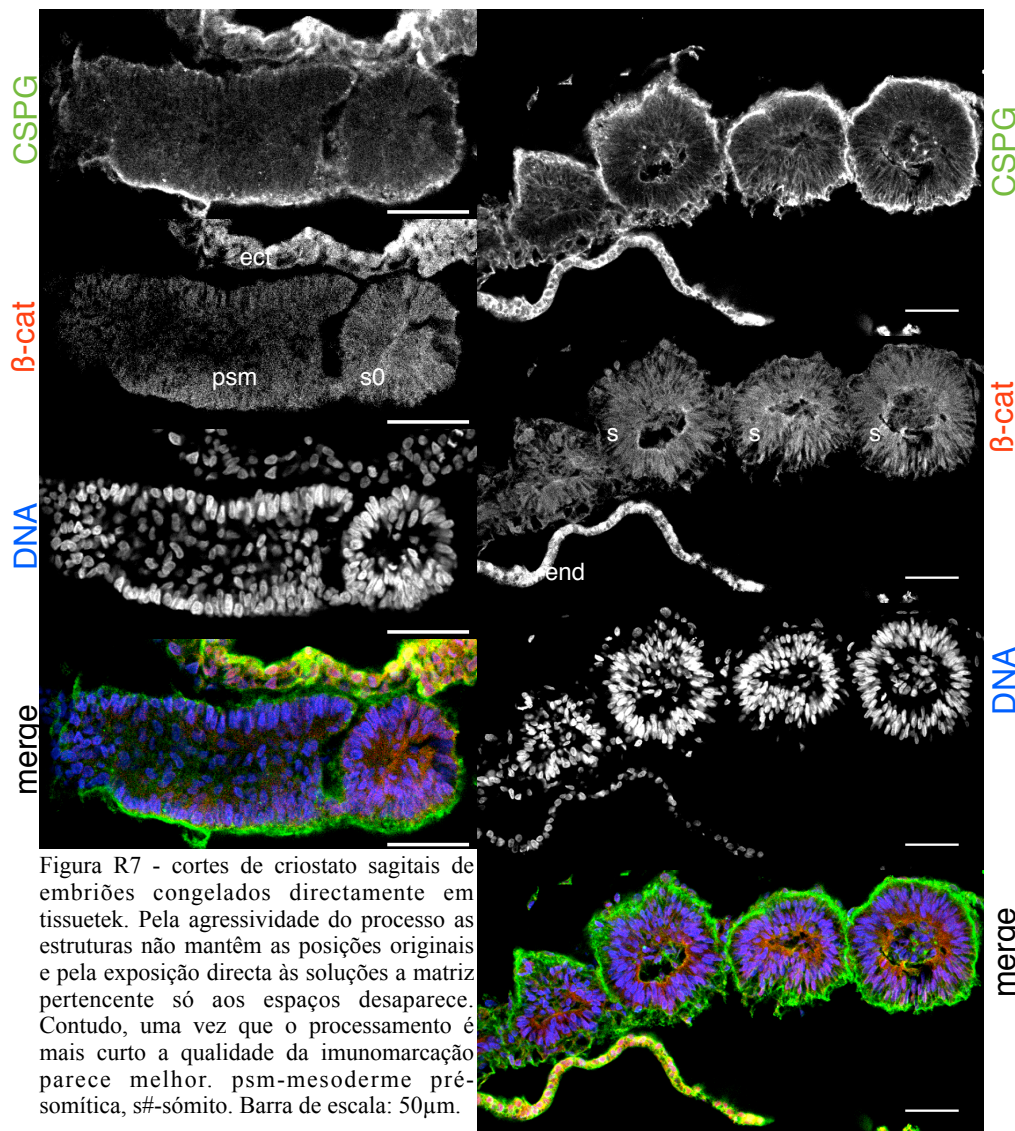


Figura R7 - cortes de criostato sagitais de embriões congelados directamente em tissuetek. Pela agressividade do processo as estruturas não mantêm as posições originais e pela exposição directa às soluções a matriz pertencente só aos espaços desaparece. Contudo, uma vez que o processamento é mais curto a qualidade da imunomarcção parece melhor. psm-mesoderme pré-somítica, s#-sómio. Barra de escala: 50µm.

ectoderme e endoderme, tem-se CSPG a separar os próprios sómitos uns dos outros sendo um dos principais constituintes da fenda somítica desde a sua formação (sómio 0) (figuras 9 e 10).

É interessante notar que esta marcação nas primeiras fendas não é detectada pelo anticorpo 9BA12 (figuras 6:F e Fig. 3) mas é evidente quando se usa o anticorpo CS56 (figuras 9 e 10 e R11).

Há um gradiente de CSPG intersticial na PSM

Relativamente à mesoderme pré-somítica (PSM) podemos observar CSPG a cobrir dorsal e ventralmente e está também presente nos espaços que a isolam das outras estruturas. Esta zona (PSM) é também daquelas em que

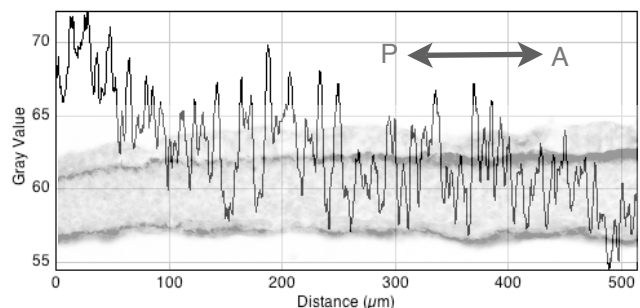


Figura R8 - Nível de CSPG no interior da PSM medido no corte visível na figura. P-posterior,

encontramos mais CSPG entre as próprias células mesodérmicas. Neste caso denota-se um gradiente crescente conforme se caminha posteriormente, i.e. na direcção do nó de Hensen (figura 11). Este gradiente é semelhante àquele que se observa a nível do espaço PSM-endoderme e oposto

àquele que se observa no espaço subectodérmico (figuras 6:A e 7).

Explantes cultivados em meio contendo condroitinase ABC

Explantes cultivados macroscopicamente distinguíveis

Com o objectivo de tentar determinar qual a função de CSPG no desenvolvimento do embrião de galinha, embriões de estadios HH12-14 foram cultivados na presença de condroitinase ABC. Embriões controlo foram cultivados em meio normal ou em meio com condroitinase inactivada por calor. Ambos os tipos de controlo desenvolveram-se normalmente. No final da cultura com condroitinase ABC os explantes experimentais apresentavam desde logo uma diferença física visível macroscopicamente. Os explantes cultivados na presença da enzima apresentam uma forma convexa, sendo esta convexidade ventral (figura 12:B e D), enquanto que os controlos tinham o aspecto plano esperado (figura 12:A e C). Observação microscópica revelou que isto deve-se ao facto da aorta dorsal estar dilatada, ocupando um volume muito maior que o normal e inflacionando toda a zona ventral por formar como que uma vesícula nesta zona que causa a convexidade observada (figura 13). Esta dilatação altera a configuração e disposição das outras estruturas nomeadamente as estruturas mesodérmicas.

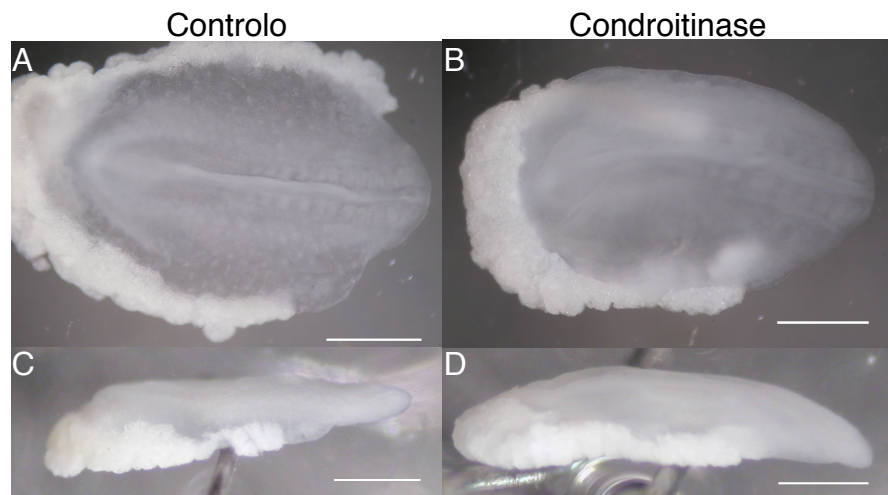


Figura R9 - Aspecto macroscópico dos explantes cultivados. A e C controlo. B e D cultivado em meio contendo 0.2U/ml condroitinase ABC. A e B vista ventral. C e D vista lateral. Barra de escala:500μm.

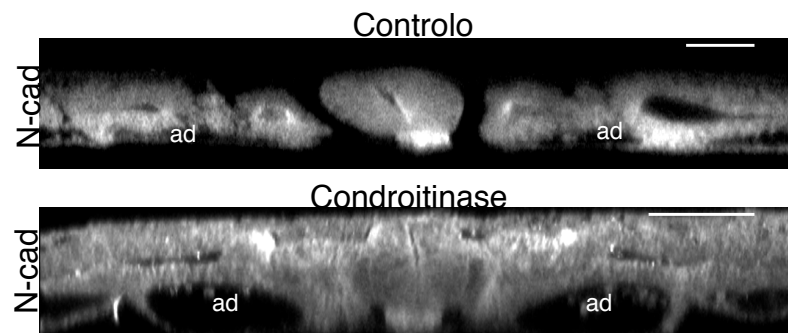


Figura R10 - planos transversais obtidos a partir de reconstruções 3D de imagens de confocal mostrando diferenças na morfologia da aorta dorsal entre explantes cultivados sem e com condroitinase marcados para N-caderina (N-cad). ad-aorta dorsal. Barras de escala: 50μm.

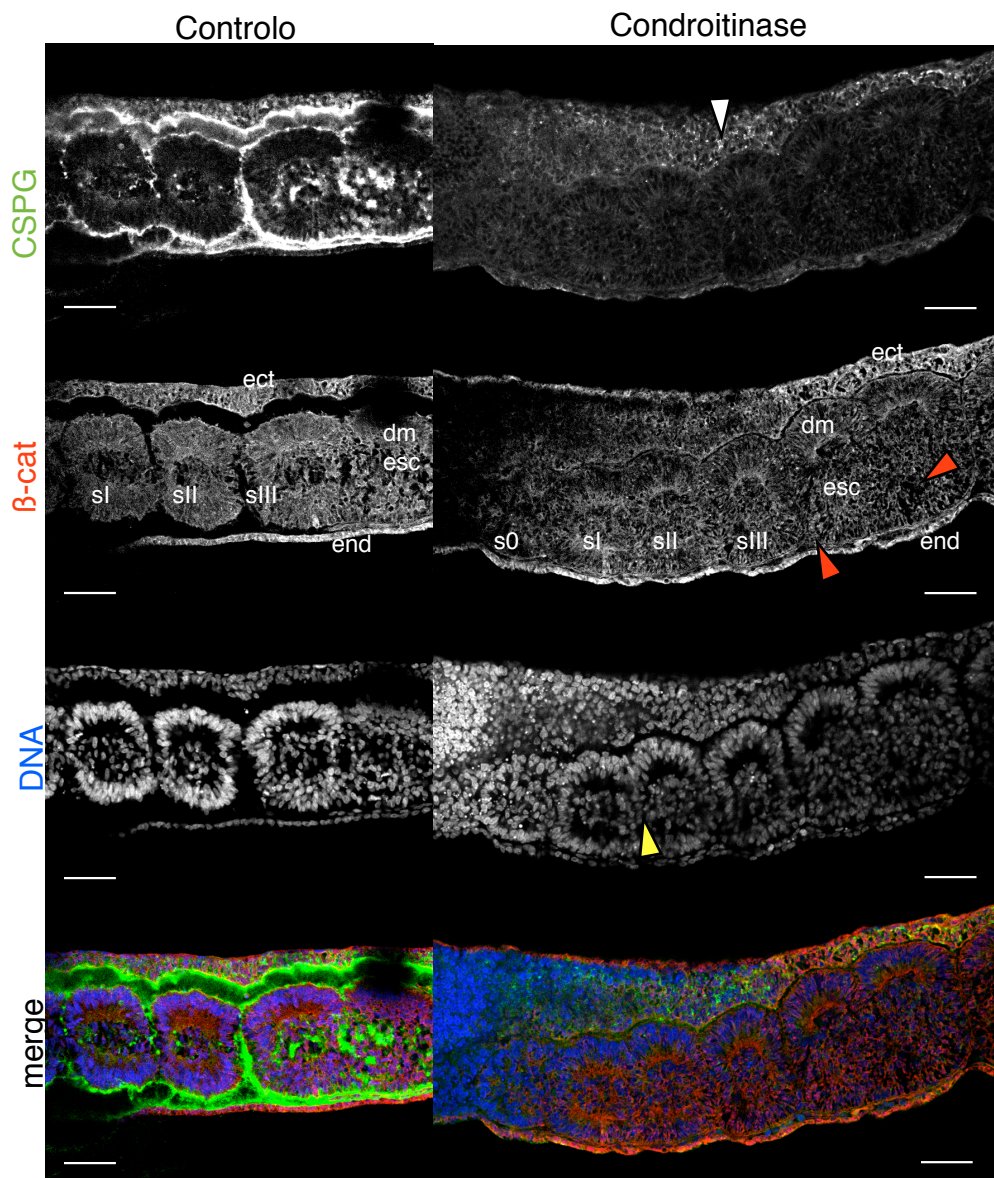


Figura R11 - Fatias sagitais obtidas através de imagens de microscopia confocal, atravessando sómitos de explantes cultivados por 9 horas sem e com 0.2U/ml condroitinase ABC. Marcados imunohistoquimicamente para proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) (clone CS-56), β-catenina (β-cat) e DNA. Barra de escala: 100µm.

Ectoderme e endoderme são responsáveis pela produção de CSPG

Mesmo na presença da condroitinase denotam-se pontos de imunoreactividade intensa no interior da ectoderme (figura 14:ponta de seta branca) e também, embora em menor grau, no interior da endoderme. Parece ainda que essa imunoreactividade não é só extracelular mas também intracelular (em vesículas) o que nos indica que estes tecidos serão produtores de CSPG.

Colapso dos espaços que separam as estruturas

Os espaços característicos que separam os diferentes tecidos do embrião nesta fase colapsam nos explantes cultivados com condroitinase. Deixou de haver espaços a separar tubo neural, ectoderme, notocorda, mesoderme intermédia, sómitos e PSM, isto é, os espaços característicos que

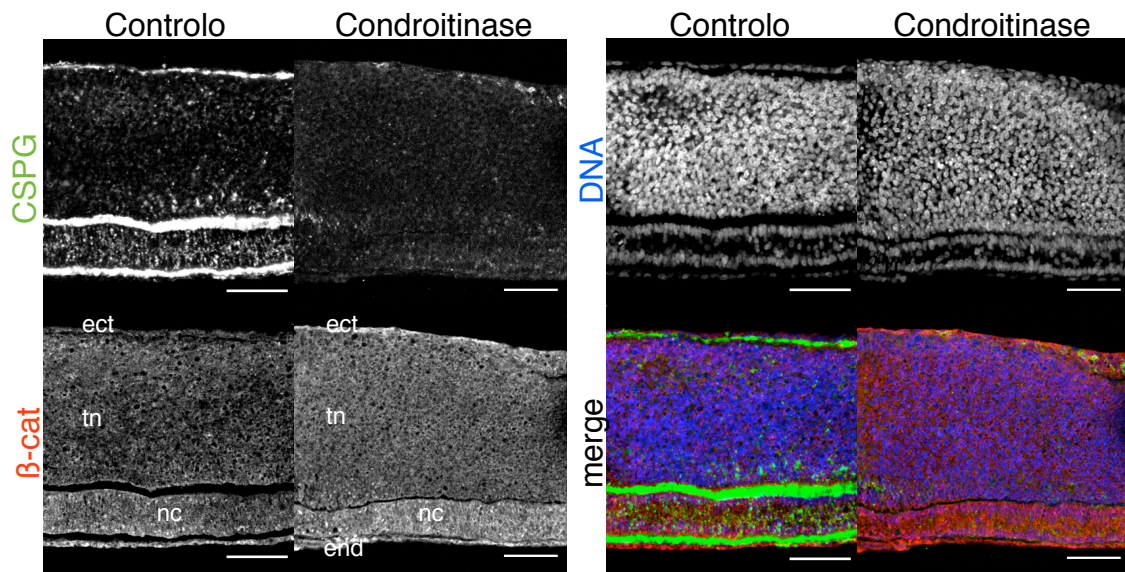


Figura R12 - Fatias sagitais atravessando o tubo neural e a notocorda obtidas a partir de imagens de microscopia confocal de explantes cultivados por 9 horas sem e com 0.2U/ml condroitinase ABC. Os embriões foram

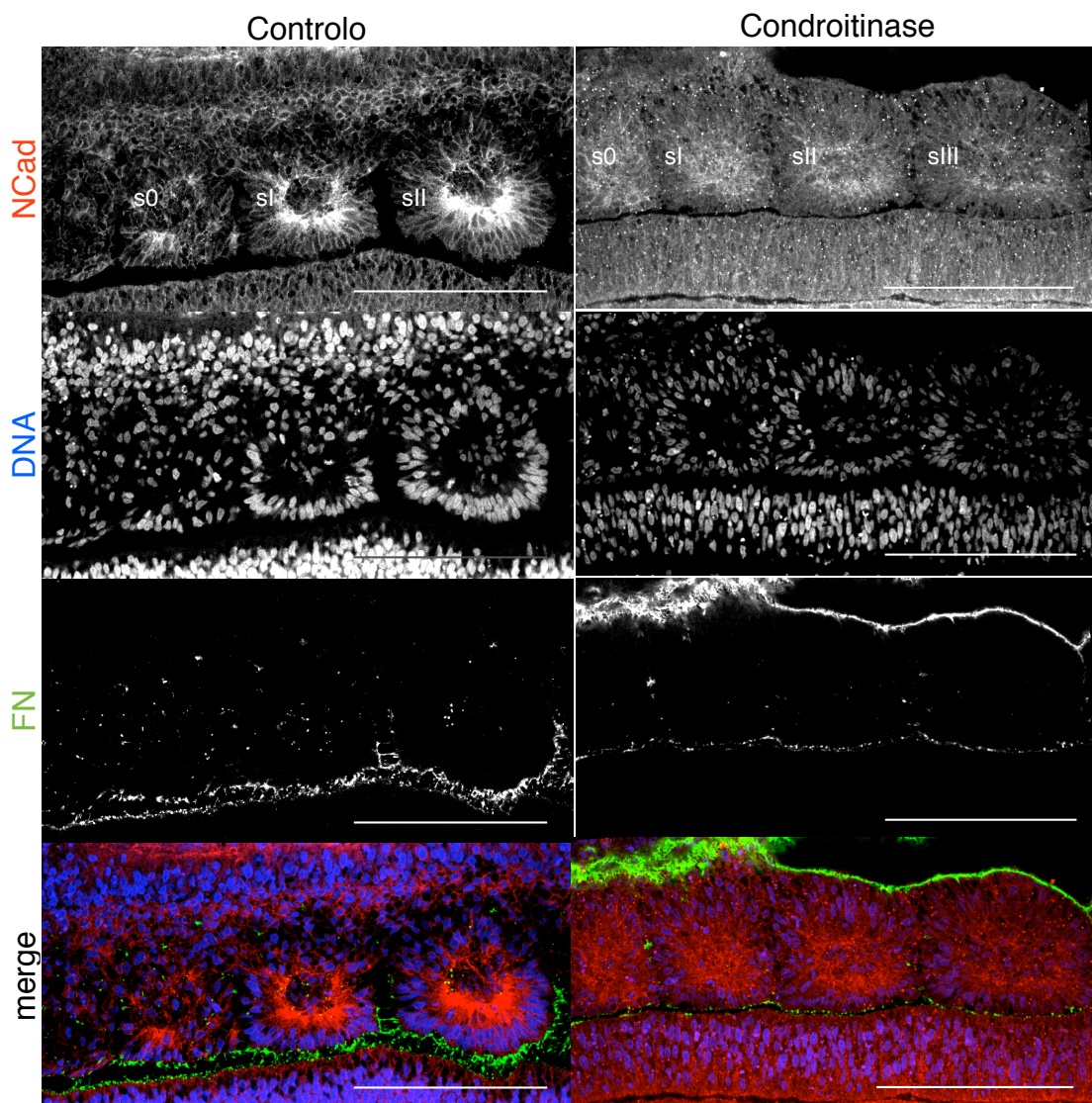


Figura R13 - fatias de microscopia confocal de um plano longitudinal atravessando os somitos em explantes cultivados por 9 horas sem e com 0.2U/ml condroitinase ABC. Marcados para N-caderina (NCad), fibronectina (FN) e DNA. Barra de escala: 100µm.

envolvem o tubo neural, a notocorda, a PSM e os sómitos deixam de existir passando estas estruturas a estar justapostas. A PSM fica justaposta à ectoderme assim como à endoderme e o mesmo se passa com os sómitos. Do mesmo modo esta mesoderme paraxial está justaposta lateralmente ao tubo neural e à notocorda por um lado e será quase indistinguível da mesoderme intermédia pelo outro. A própria mesoderme intermédia está justaposta à mesoderme lateral. A notocorda está justaposta ao tubo neural, à mesoderme paraxial e à endoderme. A fenda somítica também está ausente, estando os sómitos, no mínimo, justapostos uns aos outros (figuras 14, 15 e 16).

Sómito epitelial é afectado - estabilidade da epitelização é afectada

Embora o número de sómitos formado e volume dos sómitos não sejam significativamente diferentes (análise estatística ainda não concluída, embora os valores preliminares indiquem que não haja diferenças significativas), denota-se falhas na polarização das células que formam o seu epitélio (figura 14).

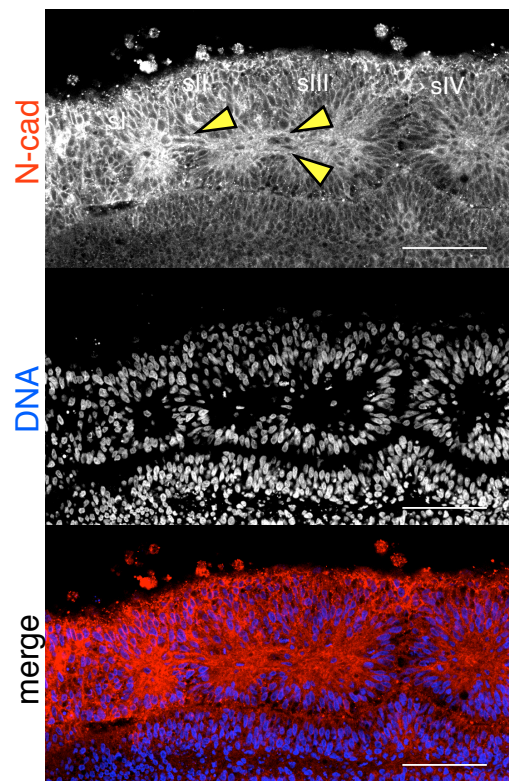


Figura R16 - plano longitudinal médio mostrando sómitos pontualmente fundidos (pontas de seta). Barra de escala: 50µm.

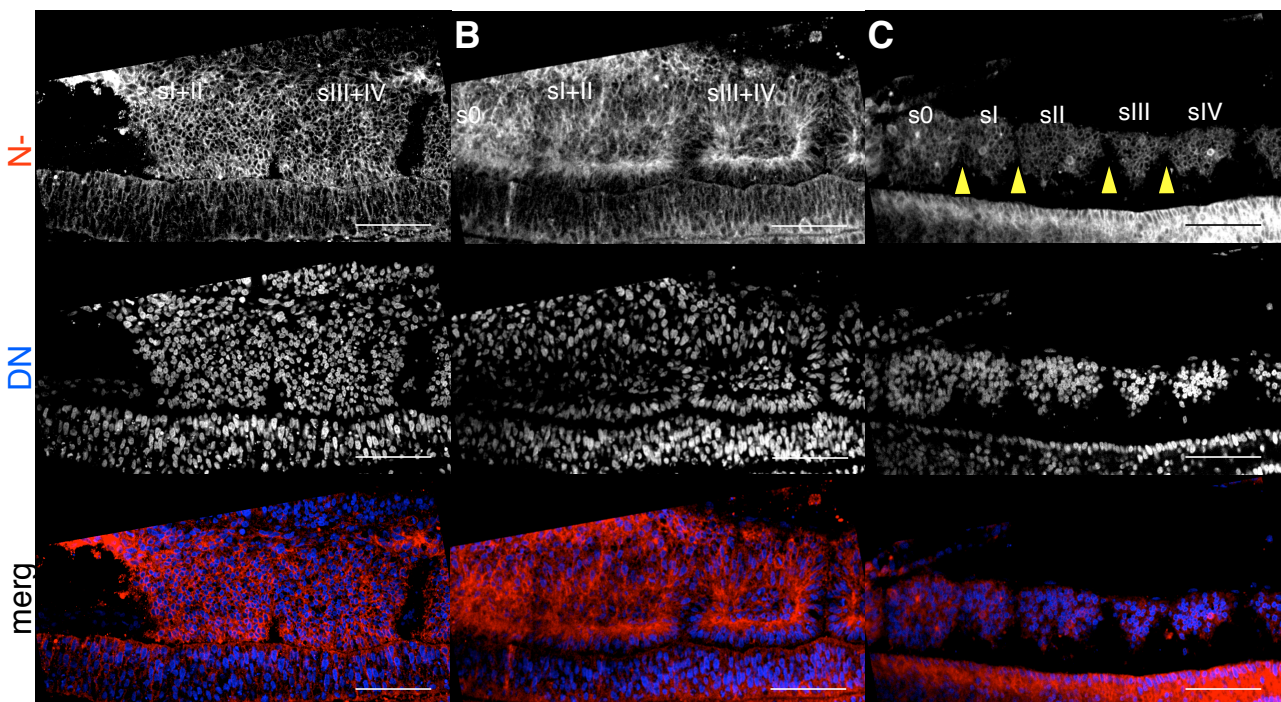


Figura R17 - Planos longitudinais mostrando sómitos fundidos em explantes cultivados por 9 horas sem e com 0.2U/ml condroitinase ABC. Marcados imunohistoquimicamente para N-caderina (N-cad) e DNA. A-secção dorsal dos sómitos. B-secção média. C-secção ventral. s#-sómito, pontas de seta-fendas somíticas. Barra de escala: 50µm.

Veja-se a disposição de N-caderina envolvendo (mal) o somitocélio e a disposição alterada dos núcleos em volta deste somitocélio (figuras R11, 16, 17 e 18). Por vezes há até células que não se sabe muito bem a que sómito pertencem (figura R11:ponta de seta amarela) e por vezes há mesmo pontos em que os dois somitocélios estão ligados (figura 17). Noutros casos ainda os sómitos fundem completamente (figura 18:B). Nestes casos de fusão total, mantém-se o início da formação da fenda na parte ventral (figura 18:C), enquanto se dá uma fusão total na parte dorsal (figura 18:A), indicando eventualmente que os sómitos epiteliais se formam, fundindo de seguida por falta de separação entre os epitélios.

Como consequência desta “desorientação” celular os somitocélios passam a ser menores (medições e análise estatística ainda não concluída, mas os resultados preliminares parecem indicar que os somitocélios são significativamente menores) e menos regulares e o número de células mesenquimatosas parece ser maior (figura 16).

Primórdios vasculares não se formam

Os primórdios vasculares que normalmente surgem entre os sómitos, nos explantes sujeitos a condroitinase não se formam (figuras 16 e 19, pontas de seta vermelhas) indicando que a CSPG é essencial para a formação do espaço necessário para invasão da vasculatura na fenda intersomítica.

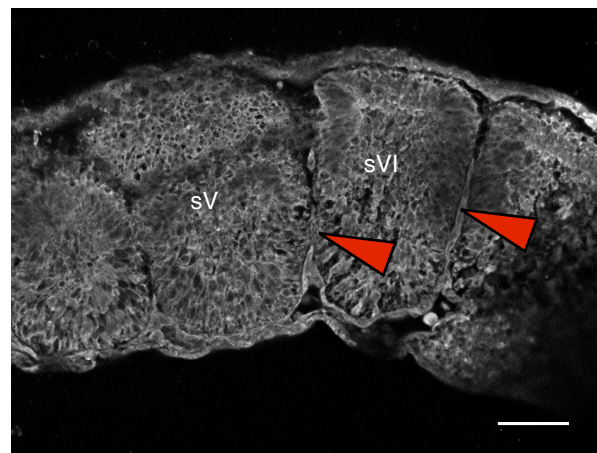


Figura R19 - Corte sagital marcado imunohistologicamente para β -catenina num embrião de estado HH12-14 mostrando os primórdios vasculares. s#-sómito. Barra de escala: 50 μ m

Matriz de fibronectina é alterada

A matriz de fibronectina normalmente presente nos espaços entre as estruturas embrionárias fica, com a redução de CSPG, também reduzida e a que existe parece menos complexa (figura 16) (medições e análise estatística ainda não concluída).

Por outro lado no interior da mesoderme paraxial, especialmente nos sómitos, embora a quantidade de fibronectina geral seja semelhante, parece que há mais fibronectina dispersa, não estando tão concentrada nas fendas.

Alterações de forma

O colapso dos espaços causada pela remoção enzimática da CSPG faz com que, além de justapostas, as estruturas do embrião alterem a sua forma. Isto acontece de forma mais drástica com

a notocorda que deixa de ter a sua forma cilíndrica ficando espalmada sob o tubo neural (figura 20). Os sómitos também deixam de ter a sua forma esférica normal (figura 20:A,B). Outro factor potencialmente importante na estranha forma do sómito é a hipertrofia da aorta dorsal que faz alterar a disposição da mesoderme intermédia e lateral alternando o “encaixe” do sómito. A ectoderme também parece ser afectada, estando mais dispersa (provavelmente por estar enrugada pela compactação do embrião) e ocupando um volume maior em z.

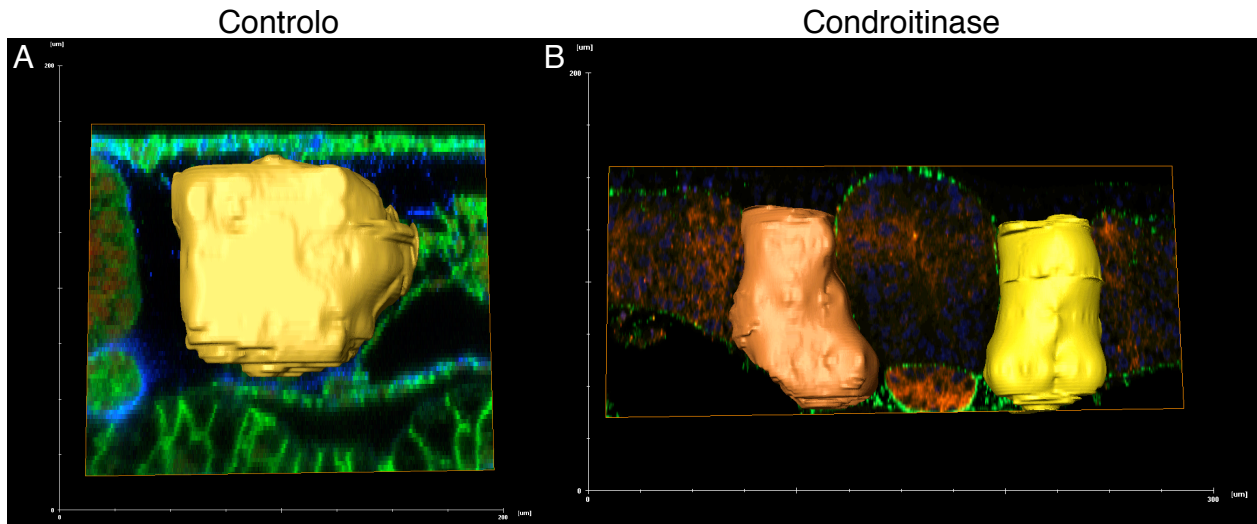


Figura R20 - reconstruções 3D da superfície de sómitos sobre fatias transversais em microscopia confocal mostrando diferenças na forma e disposição destes.

Discussão

É preciso referir que há alguma variedade de anticorpos no que concerne a proteoglicanos (PGs). Quando se trata na detecção de glicosaminoglicanos (GAGs), dada a sua grande heterogeneidade intrínseca {Couchman, 1984 #213}, e alterações que sofre ao longo dos processos embrionários (sulfatação por exemplo {Salgueiro, 2006 #255}), torna-se difícil encontrar um anticorpo funcional que detecte apenas aquele grupo de GAGs e, ao mesmo tempo, todos os elementos daquele grupo de GAGs em todas as suas variantes. Numa primeira abordagem é isto que se deseja.

Uma solução é usar vários anticorpos alternativos para o GAG. Outra, que parece ser mais fiável e mais informativa, é usar anticorpos que detectam a proteína central do PG em estudo. Isto implica que, se queremos a distribuição geral de um determinado GAG, temos de marcar imunohistoquimicamente todos as proteínas centrais envolvidas. Em GAGs que não formem PGs independentes, como ácido hialurónico (HA), marcar uma proteína que *geralmente* se associe ao GAG torna-se provavelmente insuficiente. Neste trabalho em relação aos CSPGs usamos 2 anticorpos de distribuição *supostamente* geral pelo que os resultados serão mais fiáveis e, provavelmente representarão a distribuição geral de CSPGs no embrião. Contudo não podemos excluir a hipótese de haver alguma variante de CSPG que não tenha sido detectada por nenhum dos anticorpos e, por outro lado, poderá haver outro(s) GAGs de composição mais variável que possam ser *erradamente* detectados pelo(s) anticorpo(s). Para os outros proteoglicanos, uma vez que só foi usado um anticorpo para cada PG/GAG, o grau de certeza é bastante inferior. Basta ver o que sucede em relação a perlecan em que a nossa distribuição difere bastante da apresentada por {Soulintzi, 2007 #254} (figura D2).

Os proteoglicanos são uma presença universal na matriz extracelular desempenhando papéis morfogénicos em pontos específicos onde possuem acumulação diferencial

KSPGs e HA

No nosso estudo detectamos uma forte presença de KSPG na ectoderme do olho em desenvolvimento o que poderá indicar um papel na formação da córnea. De facto a maioria dos estudos envolvendo KSPGs no desenvolvimento reportam-nos como tendo funções importantes na morfogénese e diferenciação da córnea (figura D1) {Funderburgh, 1986 #219} {Gealy, 2007 #256}, nomeadamente na diferenciação de células da crista neural no estroma da córnea.

Nos nossos resultados observa-se KSPG e HA no miocárdio mas não na geleia cardíaca nem no endocárdio. Foi reportado que HA tem uma distribuição semelhante à de TGFβ indicando que estes funcionam em conjunto {Fenderson, 1993 #257}, *i.e.*, que HA também funciona como co-sinalizador ou então que TGFβ funciona como activador de EMT {Arciniegas, 2000 #258} e que estimula a produção de HA entre outros GAGs e proteoglicanos como CSPG {Merrilees, 2000 #259}. Se a isto associarmos que HA está presente no tecido precursor das válvulas cardíacas (*cardiac cushion tissue*) {Bernanke, 1984 #260} indo participar na formação do mesênquima cardíaco e que estimula a formação de endotélio {Ibrahim, 2008 #261}, parece provável a participação de HA na formação do miocárdio. Não parece, no entanto, muito concordante a nenhuma ou muito fraca imunoreactividade para HA, quer na geleia cardíaca quer no endotélio dos nossos resultados. Talvez por complementaridade com a distribuição de CSPGs (fortissimamente

presentes na geleia cardíaca) as coisas façam sentido. Ou então os nossos anticorpos não os detectam. Uma terceira hipótese é simplesmente ainda não estarem presentes nesta fase.

Os nossos dados parecem ainda indicar que a ectoderme, principalmente na zona cefálica, e a endoderme, principalmente na zona caudal, são responsáveis pela produção tanto de KSPG como de HA.

Nos nossos resultados os sómitos apresentam um forte presença de KSPG e HA e revestindo o somitocélio. Isto parece ser concordante com o facto de ácido hialurónico ser necessário na somitogénese, assim como o é na migração de células da crista neural e de células musculares hipaxiais {Ori, 2006 #262}. Eventualmente, tendo em conta as funções dos CSPGs (ver secção seguinte) estes dois proteoglicanos (KSPGs+HA e CSPGs) poderão ter funções opostas e complementares importantes na formação do sómito epitelial. Algo semelhante poderá ocorrer na formação do canal nefrogénico (ainda mais imunologicamente marcado nos nossos resultados). Não parece haver estudos sobre a função de KSPGs nem de HA no canal nefrogénico. Estes proteoglicanos poderão integrar um *glicocálice* que cobre o interior destas estruturas epiteliais. Algo semelhante se passa no somitocélio, e também, embora em muito menor grau, no interior do neurocélio.

Do mesmo modo estes PGs, embora estejam presentes sob o dermamiótomo, não parece haver estudos que envolvam esta estrutura transiente e estes proteoglicanos. Seria interessante abordar se esses PGs possam ter uma função, por exemplo na captação de factores parácrinos relevantes para o desenvolvimento do miótomo.

O local com maior intensidade de KSPG e HA nos nossos resultados é a notocorda (tirando talvez a endoderme na porção mais caudal). É possível que seja relevante nos processos de reorganização epitelial no interior da notocorda ao que podemos ainda associar movimento epitelial de que HA parece ser propulsor {Haddon, 1991 #263} e o facto de existir uma fortíssima barreira anti-migração em torno da notocorda, construída por CSPGs como os nossos resultados demonstram.

Embora os nossos estudos revelem uma fortíssima presença de HA na notocorda existem vários estudos sobre PGs e GAGs na embriogénese {Peterson, 1993 #264; Peterson, 1993 #265; Gotz, 1995 #266} que curiosamente não referem especial marcação para ácido hialurónico no interior desta estrutura. Poderá ter a ver também com diferenças nos anticorpos usados.

perlecan

Imunoreactividade para perlecan no nosso caso, em que o clone usado (clone 5C9 {Halfter, 1993 #267} detecta o domínio IV da perlecan recentemente associada como contendo uma sequência peptídica activa na rápida adesão celular, migração celular e na activação de cinase adesão focal (FAK) {Farach-Carson, 2008 #268}, apresenta grandes diferenças para outros estudos recentes {Soulintzi, 2007 #254}. No nosso caso só há uma imunoreactividade forte nas lâminas basais (figura D2). {Soulintzi, 2007 #254}, que utilizaram o clone 33/33-2 {Bayne, 1984 #269}, observam uma forte reactividade na matriz do tubo neural, no interior da notocorda, nas células da crista neural, endoderme inferior, nos tubos nefrogénicos, no miocárdio. Deve-se provavelmente às diferenças nos anticorpos usados.

É interessante também verificar a fortíssima imunoreactividade de KSPGs e HA no interior da notocorda, a presença de perlecan na sua lâmina basal e uma quase ausência de CSPGs no seu interior mas preenchendo todo o espaço envolvente. Dir-se-ia que estes PGs

se complementam em distribuição e, conseqüentemente, muito provavelmente em funções na embriogénese.

CSPGs: proteoglicanos incontornáveis...

Dois anticorpos, muitos CSPGs

Embora os dois anticorpos usados para a imunodeteccção de CSPGs revelem grandes semelhanças no geral, apresentam algumas diferenças: (1) A imunoreactividade de CS-56 {Avnur, 1984 #270} parece ser mais forte uma vez que se trata de um anticorpo mais geral. (2) A imunoreactividade de CS56 no espaço que envolve o tubo neural e o espaço que envolve a notocorda é superior (mesmo tendo em conta o ponto anterior). (3) CS-56 marca fortemente o sómito epitelial e principalmente a sua lâmina basal, ocupando toda a fenda somítica (figura R7) enquanto o 9BA12 {Ring, 1995 #271} só revela imunoreactividade na fenda somítica numa mais tardia (figura R2:F) e passa a marcar fortemente o esclerótomo quando este se forma (figura R2:E).

{Ring, 1995 #271}, referente à distribuição de CSPGs no desenvolvimento do olho, refere os CSPG identificados por 9BA12 como 9BA12 CSPGs, em comparação com CSPGs colagénio tipo IX identificada pelo anticorpo 2B9 {Ring, 1995 #271} de distribuição mais restrita. Será que podemos denominar os CSPGs identificados pelo CS-56 mas não pelo 9BA12 como *CSPGs CS-56*? Uma análise a distribuição das diferentes proteínas centrais dos CSPG (agrecan, neurocan, versican e brevican) poderá levantar alguma luz sobre este aspecto (embora proteínas centrais não tenham necessariamente CSs diferentes associadas e CSs diferentes podem estar associadas à mesma proteína central). Parece-nos razoável sugerir que os 9BA12 CSPGs {Ring, 1995 #271} sejam de produção mais ectodérmica e endodérmica fazendo parte das suas lâminas basais, enquanto que os *CS-56 CSPGs* sejam de produção mais mesodérmica.

Gradientes subectodérmicos e sobendodérmicos

Os nossos estudos revelaram a presença de um gradiente de concentração subectodérmica de CSPG no embrião de galinha, não antes detectado. Também verificamos que há uma marcação intracelular na ectoderme e (em menor quantidade) na endoderme, sugerindo que estes tecidos sejam as principais produtoras de CSPG. É interessante notar que parece haver uma uniformidade no que concerne à produção de CSPG mesodérmica: a ectoderme e a endoderme contribuem na produção de matriz para a mesoderme, tal como acontece com a fibronectina por exemplo {Rifes, 2007 #64}.

Haver uma concentração maior de CSPG no espaço sobre a PSM anterior e os primeiros sómitos (figura R3) poderá ter a ver como um maior esforço de produção para possibilitar a formação do sómito epitelial. Em alternativa os CSPGs de produção mesodérmica podem estar a ser mobilizados da mesoderme para o espaço subectodérmico, uma vez que há um gradiente oposto quer na PSM quer no espaço sobre a endoderme. Para responder a essa questão é necessária uma análise à produção de enzimas da via de síntese de CSPGs (por hibridização *in situ* por exemplo).

Os CSPGs na mesoderme

A presença de CSPGs no desenvolvimento do coração e a sua forte presença na geleia cardíaca (Kitten 1987) como foi observado nos nossos resultados (figura D3), é há longo conhecida tal como os seus papéis na ETM do endocárdio e na formação do tecido

precursor das válvulas cardíacas {Capehart, 1999 #272; Zanin, 1999 #273; Mishima, 2003 #214; Arciniegas, 2004 #275}.

{Capehart, 2002 #276} descreve a presença de CSPG em torno da notocorda, nos mioseptos, membranas basais e na ECM do coração, especialmente na geleia cardíaca em *Morone saxatilis* (um teleósteo). Estes dados são concordantes com os nossos resultados em galinha, uma vez que os mioseptos são correspondentes aos espaços das fendas somíticas, indicando que esta distribuição de CSPGs é mantida nos vertebrados (figura D4).

Não é a primeira vez que se descreve CSPGs a preencher o espaço envolvente ao sómito. Por exemplo Tan {Tan, 1987 #277} descreve esta distribuição mas relacionada com a migração das células da crista neural (figura D5).

Os CSPGs nas vias da migração celular

Morriss-Kay {Morriss-Kay, 1989 #241}, também em relação às células da crista neural, refere CSPGs como fazendo decrescer adesividade no epitélio neural em estados e pontos específicos, facilitando emigração de células da crista neural e movimento migratório de neuroblastos. Assim também fornece flexibilidade no gerar de curvas epiteliais, fazendo decrescer a adesividade da ECM com fibronectina e proporcionando a migração de células da crista neural e células do esclerótomo.

Em embriões tratados com condroitinase ABC as células do esclerótomo não foram parar entre a aorta dorsal e o tubo neural {Morriss-Kay, 1989 #241} (figura D6). Isto deve-se ao facto da dispersão das células do esclerótomo não se ter feito convenientemente. Tal como mostram também os nossos resultados, CSPGs preenchem os interstícios das células do esclerótomo provavelmente fazendo-as afastarem-se umas das outras e consequentemente ocuparem mais volume. Os nossos resultados indicam que a falta destes espaços intercelulares e a falta de CSPGs para servirem como guia, leva a uma deficiente migração destas células

CSPGs são responsáveis pelo afastamento das massas celulares e a formação de espaço

A conclusão principal do nosso trabalho é que a deposição de CSPGs entre os tecidos é responsável pela criação e manutenção de espaços na morfogénese na medida em que o tratamento dos embriões com condroitinase ABC leva à extinção destes espaços. Nomeadamente, há uma diminuição muito significativa (às vezes quase total) dos espaços entre a ectoderme e a mesoderme, em torno da mesoderme intermédia, entre a endoderme e a mesoderme, entre o tubo neural e a ectoderme, entre o tubo neural e a mesoderme paraxial, entre o tubo neural e a notocorda e entre a notocorda e a endoderme e a mesoderme paraxial.

Visto de outro modo, no caso das massas celulares mesodérmicas, são estes espaços criados pelas CSPGs que formam primariamente as novas massas celulares. Embora estejam envolvidos receptores específicos que orientam a disposição das células em relação à matriz de CSPG e, digamos, mantêm as células no sítio {Ernst, 1995 #231}, o espaço em si deve-se apenas às suas propriedades higroscópicas, *i.e.* o elevado número de cargas aniónicas causadas pelos grupos carboxilo, sulfato ou hidróxido presentes em cada resíduo de dissacarídeo da CS, que fazem com que seja absorvida água para aquele espaço.

Possíveis funções para estes espaços são as seguintes: (1) Funcionar como barreira anti-migração {Crossin, 1989 #234} {Oakley, 1994 #235} {Landolt, 1995 #236} isolando as

massas celulares para que possam prosseguir o seu desenvolvimento nesses novos *microambientes* e impedindo interacções *indesejadas* entre tecidos independentes. (2) Permitir movimentos e reorganizações celulares dessas novas massas celulares. (3) Permitir a deposição e construção de uma matriz extracelular própria que *oriente* esses movimentos e *decida* a diferenciação dessas células. (4) Proporcionar espaço para novas construções celulares.

Consequências da eliminação de CSPGs

Os nossos estudos indicam que há efeitos específicos da eliminação dos espaços entre os diferentes tecidos do embrião de galinha nos estádios estudados. Os mais evidentes e as possíveis causas serão discutidos de seguida:

hipertrofia da aorta dorsal

A hipertrofia da aorta dorsal pode dever-se à não manutenção de um endotélio estável. A ausência de CSPG na aorta dorsal pode ter levado à proliferação de células endoteliais por falta de inibição de migração, *i.e.* se as células não forem obrigadas a permanecer epitelizadas pela barreira de CSPGs, pode haver um relaxamento da tensão do endotélio e devido à pressão interna, uma desagregação parcial do endotélio e uma proliferação destas células como resposta {Arciniegas, 2004 #275} {Mishima, 2003 #214} ou por falta de coesão e protecção contra a pressão interna ter sido estimulada a proliferar por estímulos mecânicos {Ingber, 2002 #217}. De qualquer modo esta hipertrofia levou a que os explantes flectissem sobre face dorsal tornando-se convexos na parte ventral (figura R9) e, internamente alterassem, por compressão, a disposição das estruturas mesodérmicas (figura R20).

alteração da forma dos sómitos e da notocorda

Se as células epitelizarem num espaço conveniente e com um padrão de polarização das células, simétrico, formarão estruturas esféricas ou cilíndricas como é o caso dos sómitos ou da notocorda. Se esse espaço não existir e se as massas celulares a epitelizar estiverem compactadas e justapostas formarão estruturas (mal) epitelizadas mas apenas dentro do espaço disponível, *i.e.*, o ocupado pelas próprias células enquanto mesênquima. Isto porque não há espaço para as células se movimentarem, orientarem, e aderirem umas às outras convenientemente. Como refere {Morriss-Kay, 1989 #241} CSPGs geram flexibilidade no formar de curvas epiteliais e na sua ausência haverá alterações, sendo a alteração de forma dos sómitos e da notocorda, que observamos, exemplos disso.

primórdios vasculares precisam da fenda somítica para se formarem

Para a estrutura vascular expandir e segmentar, algo que se segue à formação dos sómitos, são necessários CSPGs. Sabe-se que os CSPGs regulam a vasculogénese {Mishima, 2003 #214} {Arciniegas, 2004 #275}, mas por outro lado pode-se argumentar que seja preciso que essa vasculatura tenha espaço por onde crescer. Ambos faltaram nas nossas condições experimentais, mas pensamos que o segundo factor tenha sido preponderante nos resultados, pois mesmo na ausência da CSPGs, se o espaço lá estivesse, a vasculatura, ainda que deformada, possivelmente iria se desenvolver.

matriz de fibronectina necessita de espaço para se formar

É interessante notar que a matriz de fibronectina está menos desenvolvida nos explantes tratados com condroitinase e aparenta ser menos complexa. Com base nessa

observação, sugerimos que para a construção desta matriz (e talvez outras) seja necessário espaço para que se possa desenvolver.

fusão de sómitos e células epiteliais mal polarizadas

Se pensarmos *ad hoc* nas funções *clássicas* dos CSPGs (ver introdução) parecem óbvias as possíveis funções na formação/manutenção do sómito epitelial. Por um lado é necessário fornecer mobilidade às células para que estas se possam orientar de modo a poderem convergir, estender e polarizar. Por outro lado é necessário uma matriz de fibronectina capaz de orientar esta polarização, convergência e extensão das células {Davidson, 2006 #278} {Rifes, 2007 #64}. O padrão de distribuição de N-caderina mostra que a polarização das células somíticas é deficiente nos embriões tratados com condroitinase (figuras R13, R16 e R17). Sugerimos que seja ainda preciso que às células não seja permitido aderirem a outras células que não as que são supostas sendo portanto necessária uma barreira anti-migração formada pelos CSPGs que envolvem o sómito (figura R7).

O facto de, mesmo nos sómitos fundidos, a fenda somítica estar iniciada na face ventral (figura R17:C), é indicadora de que: (1) ou a fenda somítica se forma e depois funde por falta de uma barreira de CSPGs que impeça a adesão de células entre sómitos adjacentes e uma matriz de fibronectina conveniente que mantenha a polaridade das células; (2) ou a fenda não chega sequer a formar-se por falta desta barreira ou por falta de matriz de fibronectina. De acordo com os resultados de {Koshida, 2005 #279}, a primeira hipótese parece mais provável.

somitocélios colapsados

Um aspecto interessante relativamente a morfologia dos sómitos é a observação que o somitocélio está reduzido. Isso poderá dever-se a dois factores: (1) uma possível polarização deficiente das células e (2) a falta de CSPGs no interior do somitocélio criador de, provavelmente em conjunto com outros PGs e GAGs como KSPG e HA, uma espécie de *glicocalice* interior que mantém o espaço no somitocélio. Provavelmente a ausência desta barreira interior dificulta também a boa epitelização e polarização das células.

conclusão e perspectivas futuras

Resumindo, o nosso estudo demonstra que os CSPGs têm um papel fulcral na morfogénese mesodérmica. Sem os espaços criados pelos CSPGs não se dá uma conveniente regionalização da mesoderme e separação das massas celulares morfogénicas em pontos e tempos precisos; a matriz de fibronectina não é devidamente construída levando a uma polarização deficiente das células em transformação epitelial como sejam as dos sómitos epiteliais e as da notocorda; estruturas epiteliais como os sómitos epiteliais e a notocorda surgem deformadas pela falta de espaço para movimentos e reorganizações celulares; estruturas epiteliais perdem a sua estabilidade por falta de barreiras anti-migratórias originando situações como sómitos fundidos, aorta dorsal hipertrofiada, etc e, por fim, sem espaço para *crescer*, novas construções celulares, como sejam os primórdios vasculares, não se formam.