

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

**DETECÇÃO DA MT1-MMP NA MUCOSA INTESTINAL DE RATOS E GALINHAS
AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL**

KAMILA CAROLINE CAMARGO

Ponta Grossa
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO a UEPG)

**DETECÇÃO DA MT1-MMP NA MUCOSA INTESTINAL DE RATOS E GALINHAS
AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares

Co-orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

Ponta Grossa

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Camargo, Kamila Caroline
C172 Detecção da MT1-MMP na mucosa
intestinal de ratos e galinhas ao longo do
desenvolvimento pré e pós-natal/ Kamila
Caroline Camargo. Ponta Grossa, 2013.
60f.

Dissertação (Mestrado em Biologia
Evolutiva - Área de Concentração: Biologia
Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta
Grossa e Universidade Estadual do
Centro-Oeste.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Albertina
de Miranda Soares.

Co-Orientador: Prof. Dr. José Rosa
Gomes.

1.Rato. 2.Galinha. 3.Desenvolvimento.
4.Mucosa intestinal. 5.MT1-MMP. I.Soaes,
Maria Albertina de Miranda. II. Gomes,
José Rosa. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Universidade Estadual do
Centro-Oeste. Mestrado em Biologia
Evolutiva. IV. T.

CDD: 574.3



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 13/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **KAMILA CAROLINE CAMARGO**.

Aos vinte e seis dias do mês de março de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **KAMILA CAROLINE CAMARGO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares (Orientadora UEPG), Dr. Jose Rosa Gomes (Co-orientador UEPG) Dr^a Luzmarina Hernandez (UEM) e Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Detecção da MT1-MMP na Mucosa Intestinal de Ratos e Galinhas ao Longo do Desenvolvimento**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: DETECCÃO DA MT1-MMP NA MUCOSA INTESTINAL
DE RATOS E GALINHAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PRÉ E
PÓS-NATAL.

Ponta Grossa, 26 de março de dois mil e treze.

Prof^a Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares

Prof. Dr. Jose Rosa Gomes

Prof^a Dr^a Luzmarina Hernandez

Prof^a Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira

Orientador

Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares

Co-orientador

Prof. Dr. José Rosa Gomes

Agradecimentos

A Deus

À minha querida orientadora, Professora Doutora Maria Albertina de Miranda Soares pela paciência, compreensão, dedicação extrema e aos ensinamentos, os quais serão eternos.

Ao meu amigo e co-orientador, Professor Doutor José Rosa Gomes, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de laboratório, Andreia, Eliakin, Ju, Claudia, Willian, Thaylise, Jaime, Renata, Ligia, pela amizade e companheirismo.

As colegas do biotério Maria e Mari pelo auxílio e disposição pra ajudar.

Aos colegas de mestrado, Nayara e Denis pelas conversas e descontrações.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva pela oportunidade da realização deste trabalho.

À minha querida amiga Marinês, pela simpatia, ensinamentos e disposição pra ajudar sempre com muita alegria e fé.

A minha querida irmã Kelly, pelas palavras de motivação, apoio e vibração

nessa grande conquista desde o início, mesmo estando em outro continente.

A minha querida irmã Karine pelos momentos de descontração ao longo desta caminhada.

Ao Fábio pela paciência, companheirismo e compreensão.

A todos que fazem parte da minha vida e que, participaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Resumo

A metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) é envolvida em processos de adesão, proliferação, migração celular e morte celular durante a organogênese e na fase adulta de vertebrados. Entretanto, o seu papel no desenvolvimento do intestino delgado de vertebrados ainda não foi estabelecido. Nós formulamos a hipótese de que essa metaloproteinase de membrana teria um papel relevante no processo de desenvolvimento da mucosa intestinal. Para avaliar essa hipótese, detectou-se a marcação da MT1-MMP por imunohistoquímica na mucosa intestinal ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos e galinhas para que, a partir de uma análise comparativa, fosse possível inferir a respeito do papel dessa metaloproteinase. No período pré-natal de ratos, a marcação da MT1-MMP correlaciona com eventos que levam à morfogênese das vilosidades e estabelecimento da homeostase tecidual. No período pré-natal de galinhas, a marcação da MT1-MMP correlaciona com eventos que levam ao crescimento do intestino. No período pós-natal de ratos e galinhas, a marcação da MT1-MMP foi mantida no epitélio intestinal, o que nos levou a sugerir que essa metaloproteinase tem um papel importante na homeostase tecidual durante toda a vida adulta. Nós sugerimos que o papel da MT1-MMP na remodelação e crescimento da mucosa intestinal de ratos e galinhas está relacionado com adesão, proliferação, migração e morte de células epiteliais e migração de células mesenquimais. Esse é o primeiro trabalho que evidencia a MT1-MMP no intestino delgado de vertebrados durante o desenvolvimento, possibilitando estudos subsequentes que venham a esclarecer o papel dessa metaloproteinase na formação desse importante órgão.

Palavras chave: rato, galinha, desenvolvimento, mucosa intestinal, MT1-MMP.

Abstract

Membrane type I MMP (MT1-MMP) is involved in cellular adhesion, proliferation, migration and cell death during organogenesis and adult phase of vertebrates. However, its role in the development of the small intestine has not been established. We formulated the hypothesis that this metalloproteinase would play a relevant role in the development of the intestinal mucosa. To assess this hypothesis we detected the labeling of MT1-MMP by immunohistochemistry in the intestinal mucosa along the pre- and postnatal development of rats and chickens so that from a comparative analysis, it were possible infer about the role of this metalloproteinase. In the pre natal phase of rats, the labeling of MT1-MMP correlates with events that lead to morphogenesis of villi and establishment of the tecdual homeostasis. In the pre natal phase of chickens, the labeling of MT1-MMP correlates with events that lead to growth of the intestine. In the postnatal phase of rats and chickens, the labeling of MT1-MMP was maintained in the intestinal mucosa, which led us to suggest that this metalloproteinase have a relevant role in the tecdual homeostasis throughout adulthood. We suggest that the role of that MT1-MMP in the remodeling and growth of the intestinal mucosa of rats and chickens is related with adhesion, proliferation, migration and death of epithelial cells and migration of mesenchymal cells. This is the first work that evidence the MT1-MMP in the small intestine of vertebrates during development, making it possible that further studies will clarify its role in the formation of this important organ.

Key words: rat, chicken, development, intestinal mucosa, MT1-MMP.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
	1.1 DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO.....	12
	1.1.1 MAMÍFEROS.....	12
	1.1.2 AVES.....	14
	1.2. METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS).....	15
	1.2.1 METALOPROTEINASES NO DESENVOLVIMENTO DOS VERTEBRADOS.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
	3.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	21
	3.1.1 MAMÍFEROS.....	21
	3.1.2 AVES.....	22
	3.2 HISTOLOGIA	23
	3.3 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	23
	3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	25

4	RESULTADOS.....	25
	4.1 CAPÍTULO I - DETECÇÃO DA MT1-MMP NA MUCOSA INTESTINAL DE RATOS E GALINHAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL.....	25
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. Introdução

O intestino delgado é um órgão responsável pela finalização da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção de hormônios, sendo indispensável para a manutenção das atividades metabólicas dos seres vivos.

Morfologicamente, o intestino delgado de mamíferos pode ser dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo. Esta divisão é baseada na presença de diferentes tipos celulares e na organização e função de cada região (SMITH et al., 2000).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2010), o intestino delgado dos mamíferos é formado pelas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa.

A camada mucosa é constituída pelo tecido epitelial, lâmina própria e muscular da mucosa. Uma característica importante da mucosa é a presença de projeções digitiformes que constituem as vilosidades intestinais, que são alongadas e posicionadas em direção ao lúmen. Essas vilosidades são de grande importância, uma vez que proporcionam um grande aumento da superfície de absorção. Entre os pontos de inserção das vilosidades existem pequenas aberturas de glândulas tubulares simples, denominadas de criptas (glândulas de Lieberkühn), que se aprofundam na lâmina própria até a muscular da mucosa.

A lâmina própria da mucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras musculares lisas e fibras nervosas, ocupando a porção central das vilosidades e preenchendo os espaços entre as glândulas de Lieberkühn. As células musculares lisas são responsáveis pela movimentação rítmica das vilosidades, que é importante para a absorção dos nutrientes.

De acordo com as funções e organização do intestino delgado, este tem sido considerado um órgão evolutivamente conservado em vertebrados, embora seu tamanho e sua morfologia possam ser muito diferentes entre as espécies (SMITH et al., 2000). Há grandes variações estruturais nas camadas que o compõem e na organização da mucosa, como por exemplo, as pregas longitudinais, que são características de peixes adultos, anfíbios e répteis, são substituídas por vilosidades em aves e mamíferos. Entretanto, ambas as estruturas estão relacionadas com a mesma função que é o aumento da superfície de absorção (DAUÇA et al., 1990).

Além das vilosidades, aves e mamíferos têm como característica comum à presença dos mesmos tipos celulares epiteliais e das criptas de Lieberkühn.

Durante a morfogênese do intestino delgado em aves e mamíferos, a camada mucosa passa por um processo de remodelação bastante marcante que culminará com a formação das vilosidades e criptas intestinais, estruturas essas que dão a especificidade funcional do órgão. Em virtude disso, a formação da camada mucosa intestinal foi o foco do presente estudo.

1.1 Desenvolvimento do intestino

1.1.1 Mamíferos

A formação do sistema digestório em mamíferos tem início após o estabelecimento dos três folhetos germinativos: endoderme, mesoderme e ectoderme. A partir do dobramento lateral da placa germinativa endodérmica, envolvida pela mesoderme, forma-se uma estrutura tubular simples que dará origem a todos os órgãos do sistema digestório (SMITH et al., 2000). Com relação ao intestino, a endoderme dará origem ao epitélio, enquanto a mesoderme formará o tecido conjuntivo que o sustenta e nutre (DAUÇA et al., 1990).

Em embriões de ratos, o início da diferenciação da mucosa intestinal ocorre por volta do décimo terceiro dia de vida intrauterina (DUNN, 1967). Entretanto, as mudanças mais drásticas na mucosa intestinal são observadas entre os décimo sexto e décimo nono dias de vida intrauterina, quando ocorre a morfogênese das vilosidades intestinais (DUNN, 1967; MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981; QUARONI, 1986; DAUÇA et al., 1990; SMITH et al., 2000).

O epitélio da mucosa intestinal de embriões de ratos na semana anterior ao nascimento é uma multicamada de células morfologicamente indiferenciadas oriundas da endoderme (LOUVARD; KEDINGER; HAURI, 1992). As células epiteliais

da camada mais próxima ao lúmen estão unidas pelas junções ocludentes, em sua porção apical, que atuam obliterando o espaço intercelular de maneira a constituir uma barreira de difusão. Nas camadas mais basais, as células do epitélio apresentam poucos complexos juncionais compostos de junções ocludentes, desmossomos e junções comunicantes (MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981). Circundando o epitélio estratificado, há uma densa camada de tecido mesenquimal oriundo da mesoderme (DUNN, 1967; MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011).

No decorrer da semana que antecede o nascimento, a morfogênese das vilosidades intestinais progride por meio de três eventos: 1- Reorganização do epitélio estratificado para formar o epitélio colunar simples a partir do rearranjo de complexos juncionais entre células localizadas nas camadas basais, que leva ao surgimento de lúmens secundários (MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; MATSUMOTO et al., 2002; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). Os lúmens secundários posteriormente se fundem entre si e com o lúmen intestinal (lúmen principal), gerando assim dobras do tecido epitelial - vilosidades nascentes (MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011); 2- Perda de células epiteliais associadas à fusão dos lúmens secundários com o lúmen intestinal; 3- Expansão do epitélio intestinal em direção ao lúmen como consequência da migração de células do mesênquima entre as células epiteliais, que dará origem a lâmina própria das vilosidades intestinais (MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011).

Após o nascimento, ocorrem alterações drásticas na estrutura do intestino que levarão à sua maturação. Em organismos como ratos e camundongos, a maturação do intestino ocorre predominantemente durante os períodos de amamentação e desmame (após o décimo oitavo dia de nascimento) em decorrência da ingestão de diferentes tipos de alimentos (COLLINS et al., 2006). Na fase de desmame, há substituição gradual do leite por alimentos sólidos, ocorrendo assim à transição de uma dieta com alto teor de gordura e baixo teor de carboidratos (principalmente lactose e derivados) para uma dieta rica em carboidratos (principalmente sacarose e amido) e pobre em gorduras (WALTHALL, 2005).

Baseado no tipo de alimento ingerido pelo filhote, os pesquisadores dividem o

desenvolvimento pós-natal de ratos nos seguintes períodos: nascimento, quando ocorre um aleitamento precoce, amamentação e desmame (PACHA, 2000). Durante o período de amamentação, o número de vilosidades intestinais não muda com a idade, mas a sua altura pode alterar (WIDDOWSON, 1985; THOMSON; KEELAN, 1986). Após o desmame, as vilosidades adquirem uma altura padrão, ocorrendo proliferação celular nas criptas e migração e diferenciação celular ao longo das vilosidades para repor células perdidas no ápice - homeostase tecidual (LIPKIN, 1981).

1.1.2 Aves

O sistema digestório de aves se encontra imaturo durante a fase embrionária e, após a eclosão, esse passa a ter grande importância no crescimento desses organismos. Nos primeiros dias após a eclosão, ocorrem alterações no tubo digestório para o consumo e utilização dos alimentos. É necessário um período de maturação para que o intestino delgado atinja um tamanho adequado e o pâncreas alcance níveis de produção enzimática que não limitem a taxa de crescimento (NITSAN, 1995).

No primeiro dia de incubação artificial, ocorre o início da formação do sistema digestório (MAIORKA; ROCHA, 2009) e, após cinco dias, o intestino delgado apresenta uma mucosa composta por tecido epitelial do tipo pseudoestratificado (ASAI; OKANO; YASUGUI, 2005).

No décimo primeiro dia de incubação artificial, a mucosa intestinal possui regiões de epitélio colunar simples circundado por uma camada formada por células mesenquimais e há projeções espaçadas da mucosa em direção ao lúmen, as vilosidades nascentes (HAYES, 1965). No décimo terceiro dia de incubação artificial, as células epiteliais são altas e a mucosa é formada por muitas projeções direcionadas para o lúmen intestinal. A submucosa consiste de uma associação desorganizada de células mesenquimais (HAYES, 1965). No décimo quarto dia de incubação artificial, ocorre a internalização do intestino na cavidade abdominal (MAIORKA; ROCHA, 2009). Nos seis dias que antecedem a eclosão, vilosidades

intestinais são observadas na mucosa intestinal. A lâmina própria encontra-se no centro das vilosidades que é recoberta por um epitélio colunar simples. Vilosidades em processo de bifurcação são observadas (HAYES, 1965).

No início do período de incubação artificial, o desenvolvimento da mucosa intestinal é lento, mas na última semana o crescimento e maturação dessa camada são acelerados, ampliando sua área de superfície de absorção em cerca de cinco vezes devido ao aumento no número de células epiteliais (UNI et al., 2003; UNI; SMITH, 2011). As células caliciformes que produzem mucinas ácidas estão presentes e o tecido epitelial desenvolve rapidamente habilidades de digestão e absorção. Mudanças nas condições de incubação (temperatura e oxigenação) podem afetar esses processos fisiológicos e, conseqüentemente, alterar o desenvolvimento do intestino (UNI; SMITH, 2011).

Após a eclosão, a taxa de proliferação celular e a superfície de absorção do intestino delgado aumentam, no entanto, o tempo em que isso ocorre é diferente ao longo do órgão. No duodeno, as vilosidades quase atingem o seu crescimento máximo no sétimo dia de vida, enquanto que no jejuno e íleo o crescimento delas ultrapassa o décimo quarto dia de vida (UNI et al., 2000; ASAI; OKANO; YASUGUI, 2005). O intestino delgado também passa por mudanças funcionais devido ao tipo de alimento ingerido: de uma dieta rica em lipídios para uma dieta composta por carboidratos e proteínas (NOY; SKLAN, 2001).

Além da semelhança morfológica da mucosa intestinal entre ratos e galinhas adultos, o tempo de desenvolvimento pré-natal (21 dias) também é o mesmo. Assim, a partir de uma análise comparativa, é possível estudar moléculas candidatas a desempenhar um papel nos mecanismos de formação e maturação das principais estruturas da mucosa intestinal ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal.

1.2 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As metaloproteinases de matriz (MMPs), também conhecidas como matrixinas, compreendem uma família de endopeptidases dependentes de zinco amplamente distribuídas nos seres vivos. Essas proteínas são capazes de degradar

componentes da matriz extracelular, estando envolvidas em processos de remodelação tecidual durante o desenvolvimento dos vertebrados e na homeostase tecidual do adulto (ZITKA et al., 2010). Por outro lado, as metaloproteinases estão envolvidas em processos patológicos, como câncer, doenças vasculares, ateroma, artrite e ulceração (VISSE; NAGASE, 2003; HU et al., 2007; LÓPEZ-OTÍN; MATRISIAN, 2007).

Baseado na organização de seus domínios funcionais, as MMPs são classificadas em quatro grupos (FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009): a) MMPS arquétipas, b) matrilisinas, c) gelatinases e d) MMPS ativadas por furina.

Dentre as MMPS arquétipas, são estabelecidos três diferentes subgrupos com base nas especificidades do substrato: a) colagenases, b) estromelisinases e c) outras MMPS arquétipas. O subgrupo das colagenases é composto pelas MMP-1, MMP-8 e MMP-13, que degradam colágeno. O Subgrupo das estromelisinases compreende MMP-3 e MMP-10, que degradam muitos componentes da matriz extracelular. As estromelisinases têm papel fundamental em importantes processos, como desenvolvimento da glândula mamária, imunidade e cicatrização (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). O subgrupo das outras MMPs arquétipas compreende MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-27. A MMP-12 ou metaloelastase é a mais potente enzima elastolítica, mas pode degradar também muitos componentes da matriz extracelular, como agregan, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (OVERALL, 2002). A MMP-19 possui potente atividade de degradação de componentes da membrana basal, como colágeno tipo IV, tenascina, gelatina e agregan (STRACKE et al., 2000). A MMP-20 ou enamelisina é secretada por ameloblastos e odontoblastos, os quais são envolvidos com a formação do esmalte dentário (LLANO et al., 1997; LU et al., 2008). Por último, a MMP-27, em galinha, é capaz de degradar gelatina e caseína (YANG; KURKINEN, 1998).

Dentre as matrilisinas, temos as MMP-7 e MMP-26, que degradam muitos componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV, laminina e entactina (OVERALL, 2002). As matrilisinas têm ainda sido associadas com remodelação do útero pós-parto e com a implantação do embrião (QIU et al., 2005).

No grupo das gelatinases, destacam-se as MMP-2 e MMP-9, que estão

envolvidas com a ligação e processamento do colágeno desnaturado ou gelatina (GOMIS-RUTH, 2009), sugerindo que essas enzimas têm um importante papel na remodelação de colágeno da matriz extracelular. Assim, as gelatinases degradam colágenos dos tipos I, IV, V, VII, IX, X, elastina, fibronectina, agregan, vitronectina e laminina (OVERALL, 2002).

As metaloproteinases ativadas por furina são ainda classificadas em três subgrupos: a) MMPs secretadas, b) MMPs associadas à membrana plasmática, c) MMPs transmembranares do tipo II. O subgrupo das MMPs secretadas compreende as MMP-11, MMP-21 e MMP-28. MMP-11 é expressa durante a embriogênese, involução tecidual e cicatrização. MMP-21 tem sido detectada durante o desenvolvimento embrionário em alguns órgãos como fígado, intestino e pele (FANJUL-FERNÁNDEZ et al, 2009). MMP-28 ou epilina está envolvida com a regulação do processo de mielinização do sistema nervoso central (WERNER; DOTZLAF; SMITH, 2008). O subgrupo das MMPs associadas à membrana plasmática compreende as MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP24 e MMP-25, as quais podem estar associadas à membrana plasmática por um domínio transmembranar (MT-MMPs transmembranar do tipo I) ou via âncora de glicosilfosfatidilinositol - GPI (MT-MMPs-GPI) (ZUCKER et al., 2003). As MMPs transmembranares do tipo I são denominadas: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP24, respectivamente). Estas MMPs têm capacidade de clivar diferentes substratos, incluindo componentes da matriz extracelular. As MT-MMPs também estão envolvidas com a formação de novos vasos sanguíneos (FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009). As MMPs associadas à membrana plasmática via âncora de GPI são denominadas: MT4-MMP e MT6-MMP (MT17-MMP e MT25-MMP, respectivamente). A MT4-MMP tem uma baixa atividade enzimática, enquanto a MT6-MMP é capaz de degradar gelatina, colágeno do tipo IV, fibronectina, fibrina e proteoglicanos (VELASCO et al., 2000). O subgrupo das MMPs transmembranares do tipo II compreende as MMPs-23A e MMPs-23B, que parecem ter função no processo reprodutivo (VELASCO et al., 2000).

Todas as MMPs são secretadas em uma forma inativa, necessitando serem clivadas por outras proteases para se tornarem ativas. Por exemplo, a MMP-2 é secretada na forma inativa (proMMP-2), sendo clivada pela MT1-MMP para formar

uma molécula ativa (MMP-2). Assim, a MT1-MMP é conhecida como um ativador de proMMP-2. Além disso, as células secretam inibidores endógenos de MMPs conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Há quatro tipos de TIMP: TIMP-1, -2, -3 e -4 (CHANG; WERB, 2001). Por exemplo, a atividade da MMP-2 é regulada tanto pela MT1-MMP (ativador) como pelo TIMP-2 (inibidor) (MATRISIAN, 1990; CHANG; WERB, 2001).

1.2.1 Metaloproteinases no desenvolvimento dos vertebrados

Vários estudos relevantes têm demonstrado o papel das metaloproteinases no desenvolvimento de vertebrados. Alguns desses estudos são apresentados logo abaixo.

Holmbeck et al. (1999) demonstraram que camundongos deficientes em MT1-MMP desenvolvem uma série de anormalidades nos tecidos conjuntivo e ósseo. Da mesma forma, Yang et al. (2008) sugerem que a MT1-MMP e a MT3-MMP apresentam distintas funções no desenvolvimento do sistema esquelético de galinhas.

Longin et al. (2001) demonstraram que a MT1-MMP é expressa no testículo de embriões e adultos de ratos, juntamente com a MMP-2 e TIMP-2, e concluíram que essa pode ser uma das proteases envolvidas na remodelação dos testículos na pré-puberdade. Esses estudos concluíram ainda que MMP-2 deve estar envolvida com a drástica remodelação que ocorre no epitélio seminífero de ratos ao longo do desenvolvimento.

Oh et al. (2004) relataram que camundongos com MMP-2 e MT1-MMP inativadas morrem imediatamente após o nascimento, com insuficiência respiratória, vasos sanguíneos anormais e fibras musculares imaturas. Nesses estudos observou-se também que na ausência de MMP-2 e MT1-MMP a fusão de mioblastos *in vitro* era significativamente atrasada.

Ayoub et al. (2005) em seus estudos relataram, por meio da inibição da MMP-2 e MMP-9, que essas metaloproteinases diminuem a migração de neurônios

granulares durante a morfogênese do cerebelo em ratos no período pós-natal.

Alexander et al. (1997) em seus estudos analisaram a expressão da MMP-2 durante a formação do coração em aves e sugeriram um papel para esta protease na regulação da migração e invasão celular.

Linask et al. (2005) em seu estudos sugerem que a MMP-2 regula a coordenação dos estágios iniciais da organogênese cardíaca, afetando o fechamento ventral do coração, a proliferação celular e a degradação de componentes da matriz extracelular no mesocárdio dorsal.

Kurakata et al. (2008) relataram que MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel fundamental na morfogênese do colón em ratos, contribuindo com a degradação e remodelação da matriz extracelular.

Margagliotti et al. (2008) demonstraram o papel da MT1-MMP na migração dos hepatoblastos durante o desenvolvimento do fígado.

Alguns estudos demonstraram ainda o papel das metaloproteinases na formação dos rins de vertebrados (LELONGT et al., 1997; GUMPEL et al., 1999; KANWAR et al., 1999; LEGALLICIER et al., 2001; ARNOULD et al., 2009).

Estudos mais recentes de Bruni-Cardoso et al. (2010), inibindo a atividade da MMP-2, constataram que essa metaloproteinase contribui para a morfogênese da próstata ventral de ratos, remodelando algumas proteínas da matriz extracelular, e, consequentemente, gerando espaços para a bifurcação e alongação das estruturas epiteliais. Os autores relatam ainda a influência da MMP-2 na proliferação celular.

Dessa forma, diante do que foi exposto sobre as metaloproteinases, a metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) aparece como candidata a desempenhar um papel nos processos de migração, proliferação, dentre outros, que estabelecem a remodelação da camada mucosa do intestino delgado em aves e mamíferos.

2 Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Detectar a marcação da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) na mucosa do intestino delgado de ratos e galinhas ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal, contribuindo assim com dados que permitam no futuro estabelecer o papel desta metaloproteinase no processo de remodelação e maturação do órgão.

2.2. Objetivos Específicos

- Detectar a marcação da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) na mucosa do intestino delgado de ratos ao longo do período pré-natal e até o vigésimo quinto dia do período pós-natal;
- Detectar a marcação da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) na mucosa do intestino delgado de galinhas ao longo do período pré-natal e até o décimo quarto dia do período pós-natal;
- Estabelecer comparações entre ratos e galinhas a respeito da marcação espacial da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) durante os processos de remodelação e maturação da mucosa do intestino delgado;
- Estabelecer comparações entre ratos e galinhas a respeito da marcação temporal da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) durante os processos de remodelação e maturação da mucosa do intestino delgado.

3 Material e Métodos

3.1 Coleta e manutenção dos animais

As fases do desenvolvimento de ratos e galinhas analisadas em nossos estudos foram selecionadas com base em dados da literatura (DUNN, 1967; MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981; NEUTRA, 1989; TOYOTA; YAMAMOTO; KATAOKA, 1989; DAUÇA et al., 1990; LOUVARD; KENDIGER; HAURI, 1992; HIRAMATSU; YASUGI, 2004; MEIO et al, 2008; VAGNEROVÁ; KUCERA, 2004; PENKOVA et al., 2010).

3.1.1 Mamíferos

Após aprovação pela Comissão de Ética do Uso de Animal – CEUA - da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Parecer CEUA - 12709/2010), foram realizados os procedimentos descritos a seguir para coleta dos estágios do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos utilizados neste estudo.

Obtenção dos animais no período pré-natal: Fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram colocadas para acasalar com machos, na proporção de 3:1, no Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no período de agosto a dezembro, quando a temperatura ambiente é maior. Após 24 horas de acasalamento, os machos foram separados e esfregaços vaginais foram realizados nas fêmeas para a detecção de espermatozoides. As fêmeas contendo espermatozoides na vagina foram separadas e acompanhadas durante todo o período de desenvolvimento dos embriões. As ratas foram sacrificadas por deslocamento cervical e os embriões foram coletados nos seguintes dias: 15º, 17º, 18º e 19º (E15, E17, E18 e E19, respectivamente). Os embriões foram lavados em 1XPBS (NaCl a 137 mM; KCl a 2,7 mM; Na₂HPO₄ a 10 mM; KH₂PO₄ a 1,8 mM, pH 7,4) e fixados em paraformaldeído 2% por 48 horas à temperatura ambiente. Para cada estágio de vida intrauterina, 3 animais foram sacrificados.

Obtenção dos animais no período pós-natal: Os filhotes foram sacrificados por deslocamento cervical no dia do nascimento (F0) e nos seguintes dias de vida: 3^o, 10^o, 18^o e 25^o (F3, F10, F18 e F25, respectivamente) após o nascimento. Os intestinos delgados foram coletados, lavados em 1XPBS e fixados em paraformaldeído 2% por 48 horas à temperatura ambiente. Para cada estágio de vida após o nascimento, 3 animais foram sacrificados.

3.1.2 Aves

Após aprovação pela Comissão de Ética do Uso de Animal –CEUA - da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Parecer CEUA – 01/2012), foram realizados os procedimentos descritos a seguir para a coleta dos estágios de desenvolvimento pré e pós-natal de galinhas utilizados neste estudo.

Obtenção dos animais no período pré-natal Ovos fecundados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) foram obtidos de Matriseiro Industrial Idôneo. Após higienização, os ovos foram mantidos em incubadora com temperatura constante de 37,8°C sob 60% de umidade no laboratório de Avicultura Experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os ovos permaneceram na incubadora até os embriões atingirem os seguintes dias: 10^o, 13^o, 16^o e 21^o (E'10, E'13, E'16 e E'21, respectivamente). Animais inteiros no estágio E'10 foram coletados. Animais nos estágios E'13, E'16 e E'21 foram sacrificados por deslocamento cervical e os intestinos delgados foram removidos. Todo material coletado foi lavado em 1XPBS e fixado em paraformaldeído 2% por 48 horas à temperatura ambiente. Para cada estágio de incubação, 3 animais foram sacrificados.

Obtenção dos animais no período pós-natal: Ovos fecundados de galinha foram acompanhados até a eclosão. Os pintinhos foram alimentados com ração e mantidos em fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Os pintinhos foram sacrificados por deslocamento cervical no dia da eclosão (P0) e no 3^o, 7^o, 10^o e 14^o (P3, P7, P10 e P14, respectivamente) dias após a eclosão. Em seguida, os intestinos destes animais foram removidos, lavados em 1XPBS e fixados em

paraformaldeído 2% por 48 horas à temperatura ambiente. Para cada estágio de vida após eclosão, 3 animais foram sacrificados.

3.2 Histologia

Após fixação, os materiais coletados foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70% a 100%), por 60 minutos em cada solução à temperatura ambiente. Na sequência, procedeu-se a diafanização dos tecidos, com duas passagens de 30 minutos em xilol à temperatura ambiente. A pré-infiltração foi realizada com 2 banhos de 30 minutos em parafina líquida a 55°C. Após este processo, os materiais foram emblocados na parafina e mantidos à temperatura ambiente.

Cortes seriados de 5 µm foram depositados em lâminas silanizadas (STARFORD). Em seguida, os cortes foram desparafinizados, passando duas vezes por xilol, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente, e submetidas à série alcoólica decrescente (90% a 70%) por 5 minutos cada à temperatura ambiente.

3.3 Imunohistoquímica

Nove cortes de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento analisada de ratos e galinhas, foram selecionados e tratados três vezes com peróxido de hidrogênio 20 volumes por 10 minutos cada, a fim de inativar a peroxidase endógena. Após uma rápida passagem em 1X PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (contra a MT1-MMP humana produzida em camundongo - CHEMICON) preparado em solução 1XPBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1%, na diluição 1:500, por 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em 1XPBS, por 5 minutos cada, e submetidos ao Kit de amplificação LSAB + Sys, HRP (DAKOCYTO), conforme instruções do fabricante. Em seguida, os cortes foram lavados em 1XPBS e a marcação foi revelada incubando-os com um substrato da peroxidase, o 3,3 diaminobenzidina–DAB (SIGMA) a 37°C, por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra corados com Hematoxilina de Harris por

60 segundos. Em seguida, os cortes foram desidratados em séries crescentes alcoólicas (70% a 100%), por 2 minutos cada, e mergulhados duas vezes em xilol, por 2 minutos cada, à temperatura ambiente. Lamínulas foram limpas em diferenciador (99% de álcool e 1% ácido clorídrico) e montadas com Permount (FISHER CHEMICALS). Em um dos cortes de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento analisada de ratos e galinhas, o anticorpo primário foi omitido (Controle negativo).

3.4 Análise dos resultados

Para a análise dos resultados da imunohistoquímica, as lâminas foram fotografadas em fotomicroscópico Olympus DP72. Imagens de nove cortes com marcação para MT1-MMP de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento de ratos e galinhas, foram analisadas por dois observadores (duplo cego), que avaliaram a localização e intensidade da marcação (precipitado marrom) na região da mucosa intestinal através de unidades subjetivas (WISE; LIN; FAN, 1992; PASETTO, 2005):

(-) Ausência de marcação

(+) Fraca intensidade de marcação

(++) Moderada intensidade de marcação

(+++) Forte intensidade de marcação

Após análise individual, os dados foram confrontados e cada etapa do desenvolvimento recebeu uma classificação de acordo com as unidades acima descritas (Tabela I) e os dados obtidos foram confrontados com a literatura.

Capítulo I

DETECÇÃO DA MT1-MMP NA MUCOSA INTESTINAL DE RATOS E GALINHAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PRÉ E PÓS-NATAL

KAMILA CAROLINE CAMARGO²; JOSÉ ROSA GOMES¹; MARIA ALBERTINA DE
MIRANDA SOARES^{1*}

1. Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa/PR, Brasil.
2. Mestranda do Programa de Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, Brasil.

* Autor correspondente:

Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa/PR, Brasil CEP 84013-900. Telefone: (55) 42 32203131. E-mail: tina@uepg.br

Resumo:

A metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) é envolvida em processos de adesão, proliferação, migração celular e morte celular durante a organogênese e na fase adulta de vertebrados. Entretanto, o seu papel no desenvolvimento do intestino delgado de vertebrados ainda não foi estabelecido. Nós formulamos a hipótese de que essa metaloproteinase de membrana teria um papel relevante no processo de desenvolvimento da mucosa intestinal. Para avaliar essa hipótese, detectou-se a marcação da MT1-MMP por imunohistoquímica na mucosa intestinal ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos e galinhas para que, a partir de uma análise comparativa, fosse possível inferir a respeito do papel dessa metaloproteinase. No período pré-natal de ratos, a marcação da MT1-MMP correlaciona com eventos que levam à morfogênese das vilosidades e estabelecimento da homeostase tecidual. No período pré-natal de galinhas, a marcação da MT1-MMP correlaciona com eventos que levam ao crescimento do intestino. No período pós-natal de ratos e galinhas, a marcação da MT1-MMP foi mantida no epitélio intestinal, o que nos levou a sugerir que essa metaloproteinase tem um papel importante na homeostase tecidual durante toda a vida adulta. Nós sugerimos que o papel da MT1-MMP na remodelação e crescimento da mucosa intestinal de ratos e galinhas está relacionado com adesão, proliferação, migração e morte de células epiteliais e migração de células mesenquimais. Esse é o primeiro trabalho que evidencia a MT1-MMP no intestino delgado de vertebrados durante o desenvolvimento, possibilitando estudos subsequentes que venham a esclarecer o papel dessa metaloproteinase na formação desse importante órgão.

Palavras chave: rato, galinha, desenvolvimento, mucosa intestinal, MT1-MMP.

Abstract

Membrane type I MMP (MT1-MMP) is involved in cellular adhesion, proliferation, migration and cell death during organogenesis and adult phase of vertebrates. However, its role in the development of the small intestine has not been established. We formulated the hypothesis that this metalloproteinase would play a relevant role in the development of the intestinal mucosa. To assess this hypothesis was detected the labeling of MT1-MMP by immunohistochemistry in the intestinal mucosa along the pre-and postnatal development of rats and chickens so that from a comparative analysis, it were possible infer about the role of this metalloproteinase. In the pre natal phase of rats, the labeling of MT1-MMP correlates with events that lead to morphogenesis of villi and establishment of the tecidual homeostasis. In the pre natal phase of chickens, the labeling of MT1-MMP correlates with events that lead to growth of the intestine. In the postnatal phase of rats and chickens, the labeling of MT1-MMP was maintained in the intestinal mucosa, which led us to suggest that this metalloproteinase have a relevant role in the tecidual homeostasis throughout adulthood. We suggest that the role of that MT1-MMP in the remodeling and growth of the intestinal mucosa of rats and chickens is related with adhesion, proliferation, migration and death of epithelial cells and migration of mesenchymal cells. This is the first work that evidence the MT1-MMP in the small intestine of vertebrates during development, making it possible that further studies will clarify its role in the formation of this important organ.

Key words: rat, chicken, development, intestinal mucosa, MT1-MMP.

Introdução

Uma das proteínas efetoras do desenvolvimento de vertebrados são as metaloproteinases de membrana (MMPs), que compreendem uma família de endopeptidases dependentes de zinco. As metaloproteinases são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, estando envolvidas na remodelação tecidual durante o desenvolvimento dos vertebrados e na homeostase tecidual do adulto (ZITKA et al., 2010). Por outro lado, as metaloproteinases estão envolvidas em processos patológicos, como câncer, doenças vasculares, ateroma, artrite e ulceração tecidual (HU et al., 2007; LÓPEZ-OTÍN; MATRISIAN, 2007; VISSE; NAGASE, 2003).

Estudos vêm demonstrando o papel das metaloproteinases no processo de organogênese (ALEXANDER et al., 1997; HOLMBECK et al., 1999; KANWAR et al., 1999; LEGALLICIER et al., 2001; LONGIN et al., 2001; OH et al., 2004; AYOUB et al., 2005; LINASK et al., 2005; KURAKATA et al., 2008; YANG et al., 2007; MARGAGLIOTTI et al., 2008; ARNOULD et al., 2009; BRUNI-CARDOSO et al., 2010). É interessante que alguns desses estudos apontem que o papel das metaloproteinases no desenvolvimento é atuar na remodelação e degradação de componentes da matriz extracelular, promovendo proliferação e migração celular (ALEXANDER et al., 1997; LEGALLICIER et al., 2001; AYOUB et al., 2005; LINASK et al., 2005; BRUNI-CARDOSO et al., 2010).

Dentre as metaloproteinases que têm papel no desenvolvimento de vertebrados, a MT1-MMP é considerada importante para a formação do sistema esquelético (HOLMBECK et al., 1999; YANG et al., 2007) e de outros órgãos como o fígado, os rins e os testículos (ALEXANDER et al., 1997; KANWAR et al. 1999; LEGALLICIER et al., 2001; MARGAGLIOTTI et al., 2008).

Estudos a respeito da morfogênese da camada mucosa do intestino delgado, que é um bom modelo para o entendimento dos processos de proliferação, diferenciação, migração e morte celular que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados e que atuam na homeostase tecidual das vilosidades intestinais na vida adulta são abundantes na literatura, sendo grande parte deles relacionados aos aspectos morfológicos (DUNN, 1967; TOYOTA; YAMAMOTO;

HIRAMATSU; YASUGI, 2004; VAGNEROVÁ; KUCERA, 2004; PENKOVA et al., 2010). Há trabalhos que enfatizam o papel de fatores de transcrição chaves do desenvolvimento do intestino delgado de vertebrados (BARBARA et al., 2003; THEODOSIOU; TABIN, 2003; MCLIN; HENNING; JAMRICH, 2009; ZORN; WELLS, 2009; PINCHUK et al., 2010; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). Alguns estudos que caracterizam proteínas efetoras dos processos de morfogênese da mucosa do intestino delgado de vertebrados são também descritos na literatura (SAOTOME; CURTO; MCCLATCHEY, 2004; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011; GROSSE et al., 2011; PLAGEMAN et al., 2011).

Entretanto, não existe na literatura estudos a respeito do papel da MT1-MMP no desenvolvimento do intestino delgado, e, principalmente, na formação da mucosa, a qual possui as vilosidades e criptas intestinais que representam as unidades funcionais do órgão. Assim, o presente trabalho teve como hipótese que a MT1-MMP teria um papel relevante no processo de remodelação e crescimento da mucosa do intestino. Assim, dois vertebrados, rato e galinha, cuja morfologia do intestino delgado é semelhante foram escolhidos para a realização do presente estudo.

Para testar essa hipótese, realizou-se a detecção, por imunohistoquímica, da MT1-MMP na mucosa intestinal de ratos e galinhas ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal, em estágios relacionados à diferenciação anatômica e funcional deste órgão. Os resultados foram avaliados a partir de uma análise comparativa, a fim de inferir a respeito do papel da MT1-MMP na remodelação e maturação da mucosa intestinal.

Material e Métodos

Material Biológico

As fases do desenvolvimento de ratos e galinhas analisadas em nossos estudos foram selecionadas com base em dados da literatura (DUNN, 1967; DAUÇA et al., 1990; HIRAMATSU; YASUGI, 2004; VAGNEROVÁ; KUCERA, 2004; PENKOVA et al., 2010).

Após aprovação pela Comissão de Ética do Uso de Animal – CEUA - da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Parecer CEUA - 12709/2010 e Parecer CEUA 01/2012), foram realizados os procedimentos descritos a seguir para coleta dos estágios do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos e galinhas utilizados neste estudo.

Obtenção dos animais no período pré-natal

Fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram colocadas para acasalar com machos, na proporção de 3:1. Após 24 horas, os machos foram retirados e esfregaços vaginais foram realizados nas fêmeas para a detecção de espermatozoides. As fêmeas contendo espermatozoides na vagina foram separadas e acompanhadas durante todo o período de desenvolvimento dos embriões. As ratas foram sacrificadas por deslocamento cervical e os embriões foram coletados nos seguintes dias: 15º, 17º, 18º e 19º (E15, E17, E18 e E19, respectivamente).

Ovos fecundados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) foram obtidos de Matriseiro Industrial Idôneo. Após higienização, os ovos foram mantidos em incubadora com temperatura constante de 37,8°C e 60% de umidade, sendo realizada a viragem dos ovos todos os dias. Os ovos permaneceram na incubadora até os embriões atingirem os seguintes dias: 10º, 13º, 16º e 21º. (E'10, E'13, E'16 e E'21, respectivamente). Animais inteiros no estágio E'10 foram coletados. Animais nos estágios E'13, E'16 e E'21 foram sacrificados por deslocamento cervical e o intestino delgado foi removido.

Obtenção dos animais no período pós-natal

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o intestino delgado foi removido no dia do nascimento (F0) e nos seguintes dias: 3º, 10º, 18º e 25º (F0, F3, F10, F18 e F25, respectivamente) após o nascimento.

Ovos fecundados de galinha foram acompanhados até a eclosão. Os pintinhos foram alimentados com ração e mantidos em fotoperíodo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Os pintinhos foram sacrificados por deslocamento cervical e o intestino delgado foi removido no dia da eclosão (P0) e no 3º, 7º, 10º e 14º (P0, P3, P7, P10 e P14, respectivamente) dia após eclosão.

Para cada estágio do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos e galinhas, 3 animais foram sacrificados.

Todo material coletado foi lavado em 1X PBS, pH 7,4, e fixado em paraformaldeído 2%, por 48 horas à temperatura ambiente.

Processamento para histologia

Após fixação, todo material foi submetido à histologia convencional. Cortes seriados de 5 µm foram obtidos em lâminas silanizadas (STARFORD). Em seguida, os cortes foram desparafinizados, passando 2 vezes por xilol, por 5 minutos cada à temperatura ambiente e submetidos à série alcoólica decrescente (90% a 70%), por 5 minutos cada à temperatura ambiente.

Imunohistoquímica

Nove cortes de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento analisada de ratos e galinhas, foram selecionados e tratados três vezes com peróxido de hidrogênio 20 volumes por 10 minutos cada, a fim de inativar a peroxidase endógena. Após uma rápida passagem em 1X PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (contra a MT1-MMP humana produzida em camundongo - CHEMICON) preparado em solução 1XPBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1%, na diluição 1:500, por 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em 1XPBS, por 5 minutos cada, e submetidos ao Kit de amplificação LSAB + Sys, HRP (DAKOCYTO), conforme instruções do fabricante. Em seguida, os cortes foram lavados em 1XPBS e a marcação foi revelada incubando-os com um substrato da peroxidase, o 3,3 diaminobenzidina–DAB (SIGMA) a 37°C, por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra corados com Hematoxilina de Harris por 60 segundos. Em seguida, os cortes foram desidratados em séries crescentes alcoólicas (70% a 100%), por 2 minutos cada, e mergulhados duas vezes em xilol, por 2 minutos cada, à temperatura ambiente. Lamínulas foram limpas em diferenciador (99% de álcool e 1% ácido clorídrico) e montadas com PermOUNT

(FISHER CHEMICALS). Em um dos cortes de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento analisada de ratos e galinhas, o anticorpo primário foi omitido (Controle negativo).

Análise de resultados

Para a análise dos resultados da imunohistoquímica, as lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus DP72. Imagens de nove cortes com marcação para MT1-MMP de cada animal, para cada etapa do desenvolvimento de ratos e galinhas, foram analisadas por dois observadores (duplo cego), que avaliaram a localização e intensidade da marcação (precipitado marrom) na região da mucosa intestinal através de unidades subjetivas (WISE; LIN; FAN, 1992; PASETTO, 2005):

(-) Ausência de marcação

(+) Fraca intensidade de marcação

(++) Moderada intensidade de marcação

(+++) Forte intensidade de marcação

Após análise individual, os dados foram confrontados e cada etapa do desenvolvimento recebeu uma classificação de acordo com as unidades acima descritas (Tabela I) e os dados obtidos foram confrontados com a literatura.

Resultados

Marcação da MT1-MMP na mucosa intestinal de rato ao longo do período pré-natal

Animais no estágio E15 apresentaram mucosa intestinal com lúmen estreito e epitélio circundado pelo mesênquima. As células epiteliais apresentavam núcleos em distintas posições, não podendo ser definido se o epitélio era pseudoestratificado ou

estratificado. A marcação da MT1-MMP foi fraca nas células epiteliais e mesenquimais (Figura 1A).

Animais no estágio E17 apresentaram mucosa intestinal com lúmen amplo e era evidente o processo de morfogênese das vilosidades, uma vez que foi possível notar que o epitélio estava passando por um processo de reorganização para formação do epitélio colunar simples e que houve invasão de células mesenquimais entre células epiteliais. A marcação da MT1-MMP foi observada nos espaços entre as vilosidades em formação (Figura 1B), denominados de lúmens secundários. No epitélio e mesênquima, a marcação da MT1-MMP permaneceu fraca.

Animais no estágio E18 apresentaram mucosa intestinal com lúmen ainda, mais amplo, epitélio colunar simples e tecido de origem mesenquimal no interior das vilosidades. Células epiteliais degenerando foram observadas no lúmen principal. A marcação da MT1-MMP foi moderada no epitélio e entre fraca e moderada no mesênquima (Figura 1C).

Animais no estágio E19 apresentaram mucosa intestinal com lúmen bastante amplo, vilosidades mais alongadas e células em processo de degeneração no lúmen principal. A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio. No mesênquima, a intensidade da marcação da MT1-MMP foi similar a de E18 (Figura 1D).

Marcação da MT1-MMP na mucosa intestinal de rato ao longo do período pós-natal

Animais no estágio F0 apresentaram mucosa intestinal com intensa vacuolização das células epiteliais. Células epiteliais em processo de degeneração foram observadas no lúmen. A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio (Figura 2A).

Animais no estágio F3 apresentaram mucosa intestinal com vilosidades de tamanho mais homogêneo, menor vacuolização das células epiteliais e criptas em processo de formação. A marcação da MT1-MMP foi moderada nas células epiteliais (Figura 2B).

Animais no estágio F10 apresentaram mucosa intestinal com maior número de vilosidades, que apresentavam tamanhos diferentes. A marcação da MT1-MMP foi forte nas células epiteliais localizadas a partir da porção mediana das vilosidades e fraca nas criptas (Figura 2C).

Animais no estágio F18 apresentaram mucosa intestinal com vilosidades de tamanho bastante homogêneo e células epiteliais degenerando no lúmen. A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio e moderada nas criptas (Figura 2D e 2D').

Animais no estágio F25 apresentaram mucosa intestinal com vilosidades de tamanho uniforme e em grande quantidade, bem como criptas desenvolvidas. A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio. Nas criptas intestinais, a intensidade da marcação da MT1-MMP foi similar a de F18 (Figura 2E).

Marcação da MT1-MMP na mucosa intestinal de galinha ao longo do período pré-natal

Animais no estágio E'10 apresentaram mucosa intestinal com lúmen amplo e era evidente o processo de morfogênese das vilosidades, uma vez que foi possível notar que o epitélio estava passando por um processo de reorganização para formação do epitélio colunar simples e que houve invasão de células mesenquimais entre células epiteliais. A marcação da MT1-MMP foi forte nas regiões entre as vilosidades em formação e fraca no mesênquima (Figura 3A).

Animais no estágio E'13 apresentaram mucosa intestinal com lúmen mais amplo e um número maior de vilosidades, mas essas eram curtas. A marcação da MT1-MMP foi forte nas regiões entre as vilosidades e fraca no mesênquima (Figura 3B).

Animais no estágio E'16 apresentaram mucosa intestinal com epitélio colunar simples. Notou-se alta densidade de vilosidades com tamanho uniforme e em processo de bifurcação. É possível observar um cordão de células epiteliais no interior das vilosidades. Células epiteliais degenerando foram observada no lúmen. A

marcação da MT1-MMP foi forte nas células localizadas na base das vilosidades em processo de bifurcação e nas regiões entre as vilosidades e moderada no mesênquima (Figura 3C).

Animais no estágio E'21 apresentaram mucosa intestinal vilosidades mais altas e criptas desenvolvidas. Notou-se perda de células no ápice das vilosidades (dados não mostrados). A marcação da MT1-MMP foi forte nas células epiteliais localizadas a partir da porção mediana das vilosidades intestinais e fraca no mesênquima (Figura 3D).

Marcação da MT1-MMP durante o desenvolvimento pós-natal da mucosa intestinal de galinha

A mucosa intestinal de galinhas no dia da eclosão apresentou vilosidades mais altas e as criptas já estavam bastante desenvolvidas. A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio e nas criptas intestinais (Figura 4A).

Após três dias da eclosão, a mucosa intestinal apresentou vilosidades em processo de formação e muitas criptas. A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio e nas criptas intestinais. Notou-se a presença de células epiteliais degenerando no lúmen intestinal (Figura 4B e 4B').

Aos sete dias após a eclosão a mucosa intestinal apresentou vilosidades maiores e criptas em processo de bifurcação. A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio e nas criptas intestinais (Figura 4C).

A mucosa de galinhas de dez dias após a eclosão apresentou células em processo de degeneração no lúmen. A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio, nas criptas intestinais e nas células em processo de degeneração no lúmen (Figura 4D).

Aos quatorze dias após a eclosão a mucosa intestinal apresentou vilosidades de tamanho mais homogêneo e as criptas eram numerosas. A marcação de MT1-MMP foi forte no epitélio e nas criptas intestinais (Figura 4E e 4E').

A Tabela I apresenta os resultados da intensidade da marcação da MT1-MMP no epitélio e mesênquima nos diferentes estágios do desenvolvimento pré-natal do intestino delgado de ratos e galinhas e no epitélio e criptas intestinais nos diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal de ratos e galinhas.

Discussão

No presente estudo, detectou-se por imunohistoquímica a marcação da MT1-MMP no intestino delgado de ratos e galinhas durante o período embrionário e após o nascimento e eclosão dos filhotes e pintinhos, respectivamente, com intuito de inferir a respeito do papel dessa metaloproteinase no processo de desenvolvimento da mucosa.

A marcação da MT1-MMP é detectada em células epiteliais e mesenquimais durante a morfogênese das vilosidades intestinais

É sabido que a morfogênese da mucosa intestinal de ratos inicia-se por volta do décimo terceiro dia de vida intrauterina (DUNN et al, 1967).

No décimo quinto dia de vida intrauterina de ratos, a mucosa intestinal apresenta um lúmen estreito e o epitélio é descrito por muitos autores como estratificado (DUN et al., 1967; MATHAN; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981; QUARONI, 1986; DAUÇA et al., 1990). Entretanto, há um trabalho que descreve o epitélio intestinal neste estágio do desenvolvimento como em transição (pseudoestratificado para estratificado) (SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). As células epiteliais mais próximas ao lúmen estão unidas por junções ocludentes e as basais apresentam poucos complexos juncionais formados por junções ocludentes, desmossomos e junções comunicantes (MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981). Circundando o epitélio, há uma densa camada de tecido mesenquimal (DUN et al., 1967; MATHAM; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011). A morfologia do intestino delgado de embriões de ratos de quinze dias observada em nossos estudos está de

acordo com a descrita na literatura. Entretanto, devido à metodologia utilizada, não foi possível definir se o epitélio era pseudoestratificado ou em transição.

A marcação da MT1-MMP foi fraca no tecido epitelial e no mesênquima, indicando que essa proteína começa a ser expressa antes do início do processo de remodelação da mucosa intestinal.

Em ratos com dezessete dias de desenvolvimento intrauterino, o processo de remodelação da mucosa intestinal é evidente, sendo observado o aumento do lúmen e a morfogênese das vilosidades. A morfogênese das vilosidades pode ser dividida em três eventos principais: a) reorganização do epitélio; b) perda de células epiteliais; c) migração de células do mesênquima entre as células epiteliais (DUN et al., 1967; MATHAM; MOXEY; TRIER, 1976; TRIER; MOXEY, 1979; MADARA; NEUTRA; TRIER, 1981; TOYOTA; YAMAMOTO; KATAOKA, SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011).

A marcação da MT1-MMP foi observada em espaços entre as vilosidades em formação. Há estudos que propõe a secreção da MT1-MMP na forma de vesículas de exocitose e sugere que esse seria um novo mecanismo para potencializar a sua atividade no espaço extracelular (TARABOLETTI et al., 2002; HAKULINEN et al., 2008). Baseado nesses dados sugere-se que a MT1-MMP seja secretada nos espaços entre as vilosidades em formação para potencializar a sua atividade no processo de morfogênese. Porém, qual seria a função da MT1-MMP nesse processo? É descrito na literatura que a MT1-MMP promove degradação de proteínas ocludinas e claudinas, levando à desorganização das junções ocludentes em células endoteliais do cérebro de ratos (YANG et al., 2007). Assim, é possível sugerir que a MT1-MMP promova a desestruturação de complexos juncionais entre células epiteliais intestinais, desencadeando o processo de morfogênese das vilosidades.

A marcação da MT1-MMP também foi observada no mesênquima, porém fraca. Estudos a respeito do papel da MT1-MMP no processo de organogênese em vertebrados sugerem que essa esteja envolvida com migração de células mesenquimais (ALEXANDER et al., 1997; LEGALLICIER et al., 2001; AYOUB et al., 2005; LINASK et al, 2005). Corroborando com esses estudos há trabalhos em células

de animais adultos que propõe que a MT1-MMP promova migração celular (KOSHIKAWA et al., 2000; KOSHIKAWA et al, 2003; ITOH, SEIKI, 2006; OKU et al., 2006; TAKINO et al., 2006). Assim, é plausível supor que esta proteína esteja envolvida com migração de células do mesênquima para formação da lâmina própria das vilosidades intestinais.

Em animais no estágio E18, o processo de morfogênese das vilosidades intestinais estava em estágio mais avançado, sendo evidente a presença do tecido conjuntivo no interior dessas. Nesse estágio, células em processo de degeneração foram observadas no lúmen principal.

A marcação da MT1-MMP foi moderada no epitélio intestinal. É descrito na literatura que a MT1-MMP ao atuar na degradação de componentes da matriz extracelular pode promover tanto migração celular como morte celular programada (HOLMBECK et al., 2003; BELKAID et al., 2007; AUGUSTIN et al., 2009). Baseando-se nesses dados, sugere-se que esta proteína esteja envolvida também com morte celular programada durante a morfogênese das vilosidades.

Marcação da MT1-MMP e homeostase tecidual no intestino de ratos

Em animais no estágio E19, as vilosidades intestinais estavam bem formadas e apresentavam intensa perda de células no topo. Segundo Cheng e Tam (2000), a perda de células no ápice das vilosidades intestinais no período de 19 a 20 dias de vida embrionária indica que a homeostase tecidual observado no rato adulto é estabelecida antes do nascimento. No rato adulto, a homeostase tecidual é mantida devido à ocorrência de proliferação, migração e diferenciação celular ao longo do eixo cripta-vilosidade para repor células perdidas no topo das vilosidades (LEBLOND; STEVENS, 1948).

A marcação da MT1-MMP foi forte nas células epiteliais, o que pode indicar que essa metaloproteinase esteja envolvida com migração celular e morte celular programada para a manutenção da homeostase tecidual.

A marcação da MT1-MMP é mantida no epitélio intestinal de ratos no período pós-natal

Animais nos estágios F0 e F3 apresentaram intensa vacuolização das células epiteliais. É descrito na literatura que a vacuolização das células epiteliais é devida à absorção do colostro (DUNN, 1967; WALTHALL et al., 2005).

A marcação da MT1-MMP foi forte na membrana dos vacúolos. Conforme descrito na literatura, a MT1-MMP é uma proteína encontrada na membrana dos endossomos (ITOH; SEIKI, 2006; TOTH et al., 2007), o que explicaria nossos resultados.

A marcação da MT1-MMP em animais a partir do estágio F10 foi forte no epitélio, entretanto observou-se uma diferença espacial: no estágio F10, a marcação estava presente nas células epiteliais que compõe a parte mediana e, principalmente, apical, das vilosidades, enquanto que nos estágios F18 e F25, todo o epitélio estava igualmente marcado. Koldovsky et al. (1966) em seus estudos de cinética celular no intestino de ratos demonstraram que no período de amamentação (até 18 dias após o nascimento) a taxa de migração celular é baixa. Baseando nesses dados, é possível sugerir que a ausência de marcação da MT1-MMP nas células epiteliais localizadas na base das vilosidades no período de amamentação signifique que há sempre células recém-formadas que não iniciaram o processo de migração para o ápice.

A marcação da MT1-MMP é detectada na mucosa intestinal de embriões de galinha

Em animais no estágio E'10, a morfogênese das vilosidades intestinais já tinha iniciado. É sabido que o início do desenvolvimento da mucosa intestinal em galinhas ocorre por volta do sexto dia de incubação artificial. Entretanto, não há estudos que descrevam o início da morfogênese das vilosidades, a qual ocorre antes do nono dia de incubação artificial (COULOMBRE; COULOMBRE, 1958; HAYES, 1965; ASAI; OKANO; YASUGUI, 2005).

A marcação da MT1-MMP foi forte nas regiões entre as vilosidades. Overton e Shoup (1964) observaram que nas regiões entre as vilosidades ocorre intensa proliferação celular. Um estudo recente a respeito do papel das metaloproteinases no processo de organogênese em vertebrados relata o envolvimento da MMP-2 em proliferação celular (BRUNI-CARDOSO et al., 2010). Há estudos ainda que descrevem a MT1-MMP como um fator de crescimento que regula a proliferação de células tumorais (HOTARY e al., 2003; NISHIDA et al., 2008). Assim, é plausível sugerir que a MT1-MMP esteja envolvida com proliferação celular na região entre as vilosidades.

A marcação da MT1-MMP também foi observada no mesênquima, porém fraca. A presença da MT1-MMP no mesênquima pode ser evidência de que essa metaloproteinase esteja envolvida com migração de células dessa região para formação da lâmina própria das vilosidades.

Em animais no estágio E'13, era evidente o processo de morfogênese das vilosidades, uma vez que foi possível notar que o epitélio estava passando por um processo de reorganização para formação do epitélio colunar simples e que houve invasão de células mesenquimais entre células epiteliais.

A marcação da MT1-MMP permaneceu forte nas regiões entre as vilosidades, o que reforça o seu provável papel em promover proliferação celular.

Em animais no estágio E'16, vilosidades em processo de bifurcação foram observadas, a qual é descrita na literatura para embriões de quinze dias de incubação (HAYES, 1965). Células epiteliais degenerando foram observadas no lúmen intestinal, mas não foram encontrados dados na literatura que confirmem esse resultado.

A marcação da MT1-MMP foi forte em células localizadas na base e entre as vilosidades em processo de bifurcação. Sugere-se que essa metaloproteinase promova proliferação e migração celular que levarão à formação de novas vilosidades intestinais.

A marcação da MT1-MMP é mantida no epitélio intestinal de galinha no período pós-natal

Em animais no estágio P0, as vilosidades intestinais estavam mais altas e as criptas intestinais mais desenvolvidas. Segundo a literatura, logo após a eclosão, há um aumento na taxa de crescimento do intestino correlacionada à mudança do tipo de dieta, que passa de rica em lipídios (vitelo) para rica em carboidratos (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2000; UNI et al., 2003, NOY; SKLAN, 2001; UNI; SMITH, 2011).

A marcação da MT1-MMP foi forte e homogênea no epitélio e nas criptas, o que permite sugerir que essa metaloproteinase esteja promovendo intensa proliferação e migração celular que culminam com o aumento da altura das vilosidades intestinais.

Em animais no estágio P7, criptas intestinais em processo de bifurcação foram observadas, o que está de acordo com o descrito na literatura (UNI et al., 2000). Segundo Uni et al. (2000), nessa etapa a morfologia e o padrão de proliferação e migração celular do adulto já estão estabelecidos.

A marcação da MT1-MMP foi forte nas células do epitélio e criptas intestinais. Sugere-se que essa metaloproteinase promova proliferação e migração de células que levarão à formação de novas criptas intestinais.

Em animais no estágio P10, um grande número de células epiteliais degenerando no lúmen intestinal foi observado. Essa intensa perda de células epiteliais pode estar relacionada ao comportamento alimentar dos animais que é intenso nessa etapa do desenvolvimento (NOY; SKLAN, 2001).

A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio e nas criptas intestinais e forte no lúmen intestinal, o que permite sugerir que essa proteína esteja envolvida com morte celular programada.

Análise comparativa da marcação da MT1-MMP ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal de ratos e galinhas

MT1-MMP e morfogênese das vilosidades intestinais

Comparando-se os estágios E'10 de galinhas e E17 de ratos, nota-se eventos comuns da morfogênese das vilosidades como a reorganização do epitélio para formação do epitélio colunar simples e invasão de células mesenquimais entre as células epiteliais. Entretanto, diferentemente de ratos, no presente estudo não foram observados lúmens secundários e perda de células epiteliais durante a morfogênese das vilosidades intestinais de galinhas. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que esses eventos ocorram em etapas anteriores, não analisadas em nosso estudo e não relatadas na literatura.

A marcação da MT1-MMP durante a morfogênese das vilosidades intestinais em galinhas foi evidente nas regiões entre as vilosidades, enquanto que em ratos estava concentrada nos lúmens secundários. Essa diferença indica que a regulação espacial e temporal da morfogênese das vilosidades intestinais é distinta entre ambos os animais. A marcação da MT1-MMP foi detectada também no mesênquima em ambos vertebrados, o que reforça a idéia de que essa proteína esteja envolvida em migração de células dessa região para formação da lâmina própria.

MT1-MMP e bifurcação das vilosidades e criptas intestinais

Na mucosa intestinal de galinhas no estágio E'16 foi observada a bifurcação de vilosidades intestinais, o que está de acordo com o descrito por Hayes (1965). Entretanto, esse processo não foi observado em ratos assim como não foi encontrado relato na literatura. Sugere-se que a bifurcação de vilosidades em galinhas ocorra para promover um rápido aumento do número dessas em função de um aumento na absorção dos nutrientes oriundos do vitelo nesse período do desenvolvimento (UNI; SMITH, 2011). No presente estudo, foi também evidenciada a bifurcação das criptas intestinais em galinhas, a qual é descrita por Uni et al. (2000). A bifurcação de criptas intestinais também é descrita para ratos por Hayes (1965), porém não foi evidenciada em nossos estudos.

A marcação da MT1-MMP foi forte nas vilosidades e criptas intestinais em processo de bifurcação na mucosa intestinal de galinhas, o que permite sugerir que

essa metaproteinase participe da formação de ambas estruturas.

MT1-MMP e homeostase tecidual

A marcação da MT1-MMP observada em galinhas no estágio E'21 foi similar à observada em ratos no estágio F10. Em ambos os animais, essa etapa corresponde ao período de transição da dieta líquida para sólida. Em ratos, estudos sobre cinética celular no intestino demonstraram que a taxa de migração celular aumenta devido à mudança do hábito alimentar (fase de desmame). Em galinhas, não há dados na literatura sobre cinética celular no intestino em desenvolvimento, mas é plausível inferir que a taxa de migração celular seja mais baixa no período de absorção do vitelo. Assim, podemos sugerir uma possível relação entre a marcação da MT1-MMP e o processo de migração celular no epitélio intestinal de ratos e galinhas quando da transição para a dieta sólida.

MT1-MMP e proliferação celular

A marcação da MT1-MMP foi mais forte nas células epiteliais localizadas na porção mediana e apical das vilosidades intestinais de galinhas quando comparada a de ratos, no período de transição da dieta líquida para a sólida. Sabendo-se que a proliferação celular em galinhas é mantida em células epiteliais localizadas a partir da porção mediana das vilosidades intestinais (UNI; PLATIN; SKLAN, 1998), é possível relacionar a forte marcação da MT1-MMP com esse processo.

Conclusão

A MT1-MMP é detectada nas células epiteliais intestinais de ratos e galinhas em todos os estágios analisados ao longo do período pré e pós-natal.

A MT1-MMP correlaciona-se temporalmente com eventos que levam à morfogênese das vilosidades intestinais em ratos e galinhas e com a bifurcação das

vilosidades e criptas intestinais em galinhas.

A MT1-MMP correlaciona-se espacialmente com o período de transição da dieta líquida para sólida em ratos e galinhas

A detecção da MT1-MMP correlaciona-se temporalmente com a remodelação e maturação precoce da mucosa intestinal de galinha em relação a ratos.

Considerações Finais

Este é o primeiro trabalho comparativo que evidencia a MT1-MMP no intestino delgado de vertebrados durante o desenvolvimento. Estudos subsequentes que visem estabelecer as relações entre MT1-MMP e proliferação, migração e morte celular durante o desenvolvimento do intestino delgado de ratos e galinhas são necessários para elucidar o papel desta metaloproteinase na remodelação e maturação da mucosa.

Legendas

Figura 1. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino delgado de ratos (*Rattus norvegicus*), ao longo do desenvolvimento pré-natal, submetidos à imunohistoquímica para MT1-MMP e contracolorados com hematoxilina. **A-** E15: o lúmen é estreito (cabeça de seta) e o epitélio é circundado pelo mesênquima. A marcação da MT1-MMP é fraca nas células epiteliais (seta) e no mesênquima (asterisco). **A'**- E15: corte controle. Não há marcação da MT1-MMP no epitélio e mesênquima. **B-** E17: o lúmen é maior e o processo de remodelação da mucosa intestinal está ocorrendo, podendo ser observadas vilosidades em processo de formação. A marcação da MT1-MMP é observada nos espaços entre as vilosidades em formação (setas). **C-** E18: o lúmen é ainda maior, o epitélio é colunar simples e é evidente o tecido conjuntivo no interior das vilosidades. Células epiteliais degenerando são observadas no lúmen (seta). A marcação da MT1-MMP é moderada no epitélio (cabeça de seta) e fraca no mesênquima (asterisco). **D-** E19: o lúmen é bastante amplo, as vilosidades intestinais são curtas e largas e há intensa perda de células epiteliais (seta). A marcação da MT1-MMP é forte no epitélio (cabeça de seta) e fraca no mesênquima (asterisco). **E-** Epitélio; **EC**–Epitélio Colunar Simples; **L** – Lúmen; **LP**–Lâmina própria; **M-** Mesênquima; **TC**–Tecido Conjuntivo; **VF**–Vilosidade em Formação; **VI**–Vilosidade intestinal.

Figura 2. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino delgado de rato (*Rattus norvegicus*), ao longo desenvolvimento pós-natal, submetidos à imunohistoquímica para MT1-MMP e contracolorados com hematoxilina. **A-F0:** as células epiteliais possuem muitos vacúolos com forte marcação para MT1-MMP (seta). **A'** -Detalhe de células epiteliais degenerando no lúmen (cabeça de seta) **B-** F3: as vilosidades intestinais apresentam maior similaridade de tamanho, a vacuolização das células epiteliais diminuiu e as criptas intestinais estão em processo de formação (asteriscos). A marcação da MT1-MMP é moderada nas células epiteliais (setas). **C-** F10: há um aumento do número de vilosidades, que apresentam tamanhos diferentes. A marcação da MT1-MMP é forte nas células epiteliais localizadas a partir da porção mediana das vilosidades (seta) e fraca nas criptas (cabeça de seta). **D-** F18: há homogeneidade na altura das vilosidades e as criptas estão bem desenvolvidas. A Marcação da MT1-MMP é forte e homogênea no

epitélio (seta) e moderada nas criptas (cabeça de seta). **D'** Detalhe de células degenerando no lúmen (cabeça de seta). **E-** F25: presença de vilosidades com tamanho uniforme e em grande quantidade, bem como criptas desenvolvidas. A marcação da MT1-MMP é forte e homogênea no epitélio (seta) e moderada nas criptas (cabeça de seta). **CI**-Cripta Intestinal; **EC**- Epitélio colunar simples; **L**-Lúmen; **LP**-Lâmina Própria; **TC** – Tecido Conjuntivo; **VI**-Vilosidade Intestinal; **VIT**-Vilosidade Intestinal Transversal.

Figura 3. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino delgado de galinha (*Gallus gallus domesticus*) ao longo do desenvolvimento pré-natal, submetidos à imunohistoquímica para MT1-MMP e contracolorados com hematoxilina **A-** E'10: o lúmen é amplo e o processo de remodelação da mucosa intestinal já foi iniciado, podendo ser observadas dobras do tecido epitelial preenchidas por células mesenquimais (vilosidades em formação). A marcação da MT1-MMP é forte nas regiões entre as vilosidades em formação (seta) e fraca no mesênquima (asterisco). **B** - E'13: o lúmen é mais amplo e o número de vilosidades intestinais é maior, mas essas são curtas. A marcação da MT1-MMP é forte nas regiões entre as vilosidades (setas) e fraca no mesênquima (asterisco). **C-** E'16: o epitélio intestinal é colunar simples. Há alta densidade de vilosidades com tamanho uniforme e em processo de bifurcação (cabeça de seta branca). É possível observar um cordão de células epiteliais no interior das vilosidades (retângulo). No lúmen são observadas células epiteliais degenerando (cabeça de seta preta). A marcação da MT1-MMP é forte nas células localizadas na base e entre as vilosidades bifurcando (setas) e moderada no mesênquima (asterisco). **D-** E'21: as vilosidades são mais altas e as criptas intestinais estão desenvolvidas. A marcação da MT1-MMP é forte nas células epiteliais localizadas a partir da porção mediana das vilosidades intestinais (cabeça de seta branca) e fraca no mesênquima (asterisco). **CI**-Cripta Intestinal; **E**-Epitélio; **EC**-Epitélio Colunar Simples; **L**-Lúmen; **M**-Mesênquima; **TC**-Tecido Conjuntivo **VF**-Vilosidade em Formação; **VI**-Vilosidade intestinal.

Figura 4. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino delgado de galinha (*Gallus gallus domesticus*), ao longo do desenvolvimento pós-natal, submetidos à imunohistoquímica para MT1-MMP e contracolorados com

hematoxilina A- P0: presença de vilosidades intestinais mais altas e de criptas intestinais desenvolvidas. A marcação da MT1-MMP é forte e homogênea no epitélio (setas) e nas criptas (cabeça de seta). **B-** P3: presença de vilosidades em processo de formação (asterisco) e de muitas criptas intestinais. A marcação da MT1-MMP é forte e homogênea no epitélio (setas) e nas criptas intestinais (cabeça de seta). **B'**- Detalhe de células epiteliais degenerando no lúmen (cabeça de seta). **C-** P7: presença de criptas intestinais em processo de bifurcação (asterisco). A marcação da MT1-MMP é forte e homogênea no epitélio (setas) e nas criptas intestinais (cabeça de seta). **D-** P10: presença no lúmen de células epiteliais degenerando (cabeça de seta). A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio (seta branca), nas criptas intestinais (asterisco) e nas células degenerando no lúmen (seta preta). **E-** P14: presença de vilosidades de tamanho mais homogêneo. A marcação da MT1-MMP foi forte no epitélio (setas). **E'**- Detalhe das numerosas criptas intestinais com marcação forte para MT1-MMP (cabeça de seta). **CI**-Cripta Intestinal; **EC**-Epitélio Colunar Simples; **L**-Lúmen; **LP**-Lâmina própria; **TC**-Tecido Conjuntivo; **VI**-Vilosidade Intestinal; **VIT**-Vilosidade Intestinal Transversal.

Tabela I. Intensidade da marcação da MT1-MMP no epitélio intestinal e mesênquima nos diferentes estágios do desenvolvimento pré-natal de ratos e galinhas e no epitélio e criptas intestinais nos diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal de ratos e galinhas. (+) Fraca intensidade de marcação; (++) Moderada intensidade de marcação; (+++) Forte intensidade de marcação.

FIGURA 1.

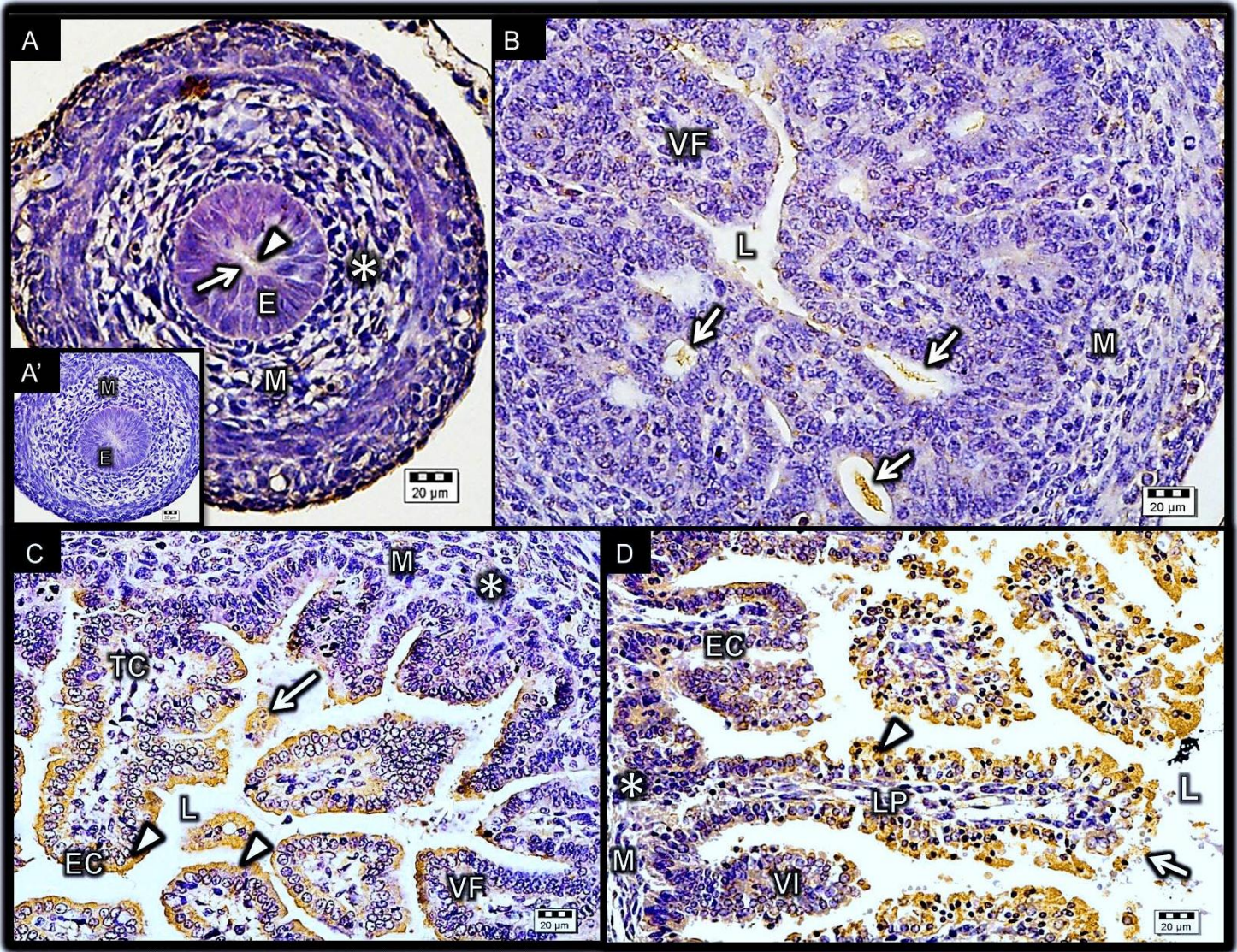


FIGURA 2.

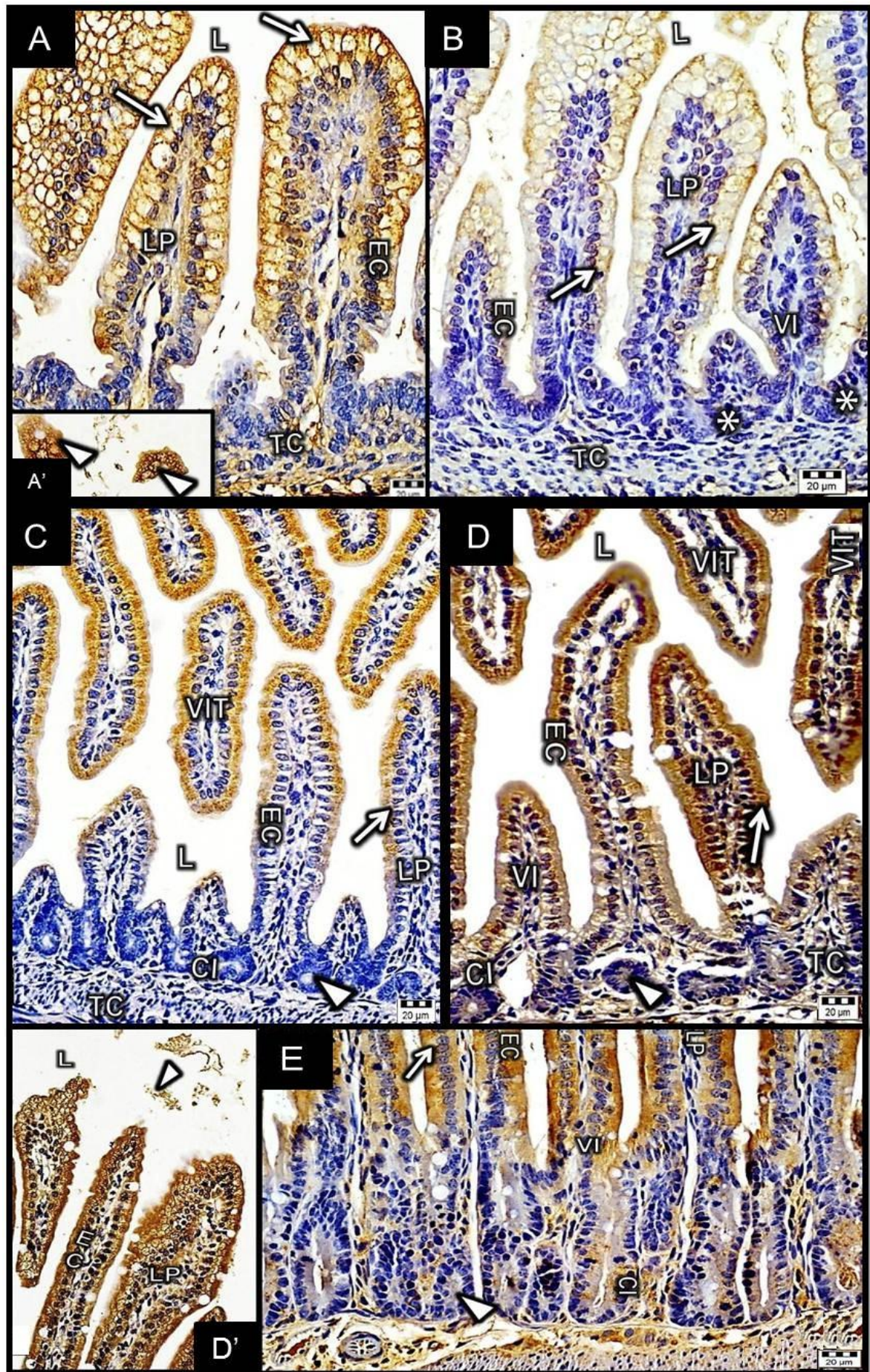


FIGURA 3.

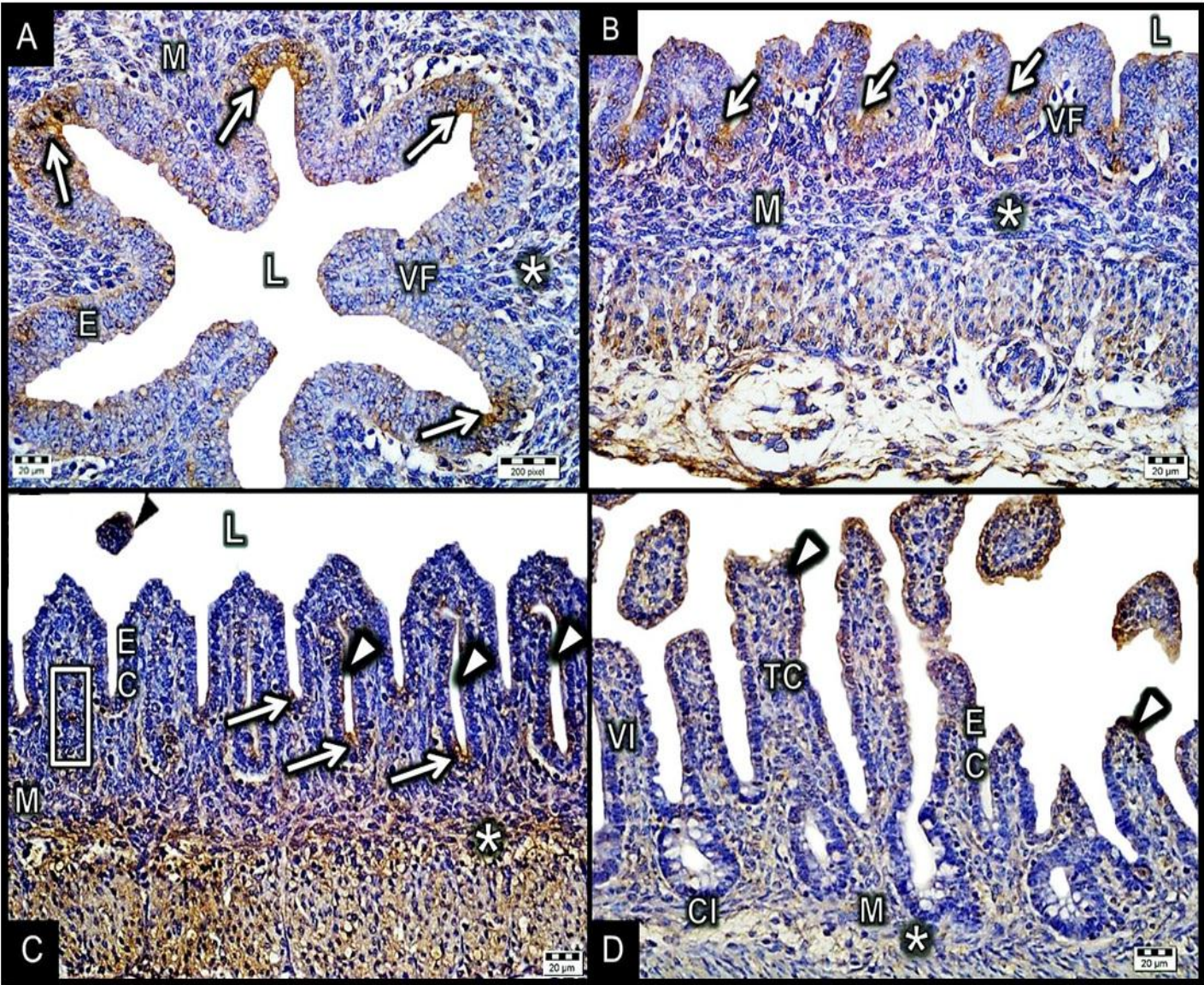


Tabela I

Marcação da MT1-MMP na mucosa intestinal durante o desenvolvimento de Mamíferos (Rato)										
Desenvolvimento pré-natal					Desenvolvimento pós-natal					
Dia	15	17	18	19	Dia	0	3	10	18	25
Epitélio	+	+	++	+++	Epitélio	+++	++	+++	+++	+++
Mesênquima	+	+	+	+	Cripta intestinal			+	++	++

Marcação da MT1-MMP na mucosa intestinal durante o desenvolvimento de Aves (Galinha)										
Desenvolvimento pré-natal					Desenvolvimento pós-natal					
Dia	10	13	16	21	Dia	0	3	7	10	14
Epitélio	+++	+++	+++	+++	Epitélio	+++	+++	+++	+++	+++
Mesênquima	+	+	++	+	Cripta intestinal	+++	+++	+++	+++	+++

5 Referências Bibliográficas

AL-NAFUSSI, A.I.; WRIGHT, N.A. Cell Kinetics in the Mouse Small Intestine during Immediate Postnatal Life. *Virchows Arch. Cell Pathol*, 40:51-62, 1982.

ALEXANDER, S.M.; JACKSON, K.J.; BUSHNELL, K.M.; MCGUIRE P.G. Spatial and temporal expression of the 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) correlates with development and differentiation of valves in the embryonic. *Avian Heart. Develop. Dyna.*, 209: 261–268, 1997.

ARNOULD, C.; LELIÈVRE-PÉGORIER, M.; RONCO, P.; LELONGT, B. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2171-2180, 2009.

ASAI, R.; OKANO, H.; YASUGI, S. Correlation between Musashi-1 and c-hairy-1 expression and cell proliferation activity in the developing intestine and stomach of both chicken and mouse. *Develop. Growth Differ*, 47, 501–510, 2005.

AUGUSTIN, S.; BERARD, M.; KELLAF, S.; PEYRI, N.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; LEGRAND, C.; HE, L. CRÉPIN, M.; Matrix Metalloproteinases Are Involved in Both Type I (Apoptosis) and Type II (Autophagy) Cell Death Induced by Sodium Phenylacetate in MDA-MB-231 Breast Tumour Cells. *Anti. Resear.* 29: 1335-1344, 2009.

AYOUB, A.E.; CAI, T.Q.; KAPLAN, R.A.; LUO, J. Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *The J. Comp. Neuro*, 481: 403-415, 2005.

BARBARA, P.S.; VAN DEN BRINK, G.R.; ROBERTS, D.J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*, 60: 1322–1332, 2003.

BELKAID, A.; FORTIER, S.; CAO, J.; AND ANNABI, B. Necrosis Induction in Glioblastoma Cells Reveals a New “Bioswitch” Function for the MT1-MMP/G6PT Signaling Axis in proMMP-2 Activation versus Cell Death Decision Neoplasia. *Bratisl* 9, 332–340, 2007.

BRUNI-CARDOSO, A.; LYNCH, C. C.; ROSA-RIBEIRO, R.; MATRISIAN, L. M.; CARVALHO, F. H. MMP-2 contributes to the Development of the Mouse Ventral Prostate by impacting Epithelial Growth and Morphogenesis. *Develop. Dyna*, 2010.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 11(11): S37–S43, 2001.

CHENG, W.; TAM, P. K. H. Apoptosis in murine duodenum during embryonic development. *Pediatr Surg Int*.;16(7):485-7, 2000.

COLLINS, J.; E. BAI, L.; XU, H.; GHISHAN F. K. Molecular Aspects and Regulation of Gastrointestinal Function during Postnatal Development. *Phys Gastro Tract*, Fourth Edition, edited by Leonard R. Johnson. Academic Press, 2006.

COULOMBRE, A. J.; COULOMBRE, J. L. Intestinal Development. Morphogenesis of the Villi and Musculature. **J. Embryol. exp. Morph.** Vol. 6, Part 3, pp. 403-411, 1958.

DAUÇA, M.; BOUZIGES, F.; COLIN, S.; KEDINGER, M.; KELLER, J.; SCHILT, J.; SIMON-ASSMANN, P.; HAFFEN, K. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Intestinal Cell Differentiation* **J. Dev. Biol.** 34: 205-218, 1990.

DUNN, J.S. The fine structure of the absorptive epithelial cells of the developing small intestine of the rat. **J. Anat**, 101, 1, pp. 57-68 57, 1967.

FANJUL-FERNÁNDEZ, M.; FOLGUERAS, A. R.; CABRERA, S.; LÓPEZ-OTÍ, C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Bio Biop Acta**, BBAMCR-16092; pages: 17; 4C: 2, 4, 6, 7, 2009.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte Dynamics and Mucosal Development in the Posthatch Chick. **P Scie** 80:776–782, 2001.

GOMES, J. R.; ALVARES, E. P. Cell proliferation and migration in the jejunum of suckling rats submitted to progressive fasting. **Braz J Med Biol Res**, 31(2), 1998.

GOMES, J. R.; PEREIRA, A. A. M; BARTH, L.; SILVA, J. S.; LEITE, M. L; WILLE.; A. C. M.; SOARES, M. A. M. Circadian variation of the cell proliferation in the jejunal epithelium of rats at weaning phase. **Cell Prolifer**, 38, 147–152, 2005.

GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases, **J. Biol. Chem.** 284 (23) 15353–15357, 2009.

GROSSE, A.S.; PRESSPRICH, M.F.; CURLEY, L.B.; HAMILTON, K.L.; MARGOLIS, B.; HILDEBRAND, J.D.; GUMUCIO, D.L. Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: implications for intestinal growth and morphogenesis. **Develop**, 138: 4423-4432, 2011.

GUMPEL, P.; KANWAR, Y.S.; OTA, K.; YANG, Q.; WADA, J.; KASHIHARA, N.; TIAN, Y.; WALLNER, E.I. Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1(MT-1-MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 277: 934-947, 1999.

HAKULINEN, J.; SANKKILA, L.; SUGIYAMA, N.; LEHTI, K.; KESKI-OJA, J. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes **J Cell Biochem**. Dec 1;105(5):1211-8. doi: 10.1002/jcb.21923, 2008.

HAYES, R. L.; The maturation of cortisone-treated embryonic duodenum in vitro. I. The villus. **J. Embryol. exp. Morph.**, Vol. 14, Part 2, pp. 161-168, 1965.

HIRAMATSU, H.; YASUGI, S. Molecular analysis of the determination of developmental fate in the small intestinal epithelium in the chicken embryo. **Int J Dev Biol**, 48: 1141-1148, 2004.

HOLMBECK, K.; BIANCO, P.; CATERINA, J.; YAMADA, S.; KROMER, M.; KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M.; ROBEY, P. G.; POOLE, A. R.; PIDOUX, I.; WARD, J. M.; BIRKEDAL-HANSEN, H. MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate. **Col Tur Cell**, Vol. 99, 81–92, 1999.

HOLMBECK, K.; BIANCO, P.; CHRYSOVERGIS, K.; YAMADA, S.; BIRKEDAL-HANSEN, H. MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. **J. Cell Bio**, Volume 163, Number 3, 661–671, 2003.

HOTARY, K. B.; ALLEN, E. D.; BROOKS, P. C.; DATTA, N. S.; LONG, M. W.; WEISS, S. J. Membrane Type I Matrix Metalloproteinase Usurps Tumor Growth Control Imposed by the Three-Dimensional Extracellular Matrix. **Cell**, Vol. 114, 33–45, 2003.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q. X.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 480–498, 2007.

ITOH, Y.; SEIKI, M. MT1-MMP: A Potent Modifier of Pericellular Microenvironment. **J Cell Physio** 206:1–8, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histo Básica**. Editora: Guanabara Koogan, 11ª edição, capítulo 15, 2010.

KANWAR, Y.S.; OTA, K.; YANG, Q.; WADA, J.; KASHIHARA, N.; TIAN, Y.; WALLNER, E.I. Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1 MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 277: 934–947, 1999.

KOLDOVSKÝ, O.; SUNSHINE, P.; KRETCHMER, N. Cellular migration of intestinal epithelia in suckling and weaned rats. **Nature**, 212: 1398–1400, 1966.

KOSHIKAWA, N. G.; GIANNELLI, V.; CIRULLI, K.; MIYAZAKI, V.; QUARANTA, K. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5, **J. Cell Biol.** 615–624.148, 2000.

KOSHIKAWA, N.; SCHENK, S.; MOECKEL, G.; SHARABI, A.; MIYAZAKI, K; GARDNER, H.; ZENT, R.; QUARANTA, V. Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology. **FASEB J express**, article 10.1096/fj.03-0584fje. December 19, 2003.

KURAKATA, H.; OKA, M.; MATSUBARA, Y.; NIWA, T.; UTSUNOMIYA, H.; FUJISHIRO, M.; MIKI, K.; FUKAMACHI, H.; KUBOTA, S.; ICHINOSE, M., Developmentally regulated expression of matrix metalloproteinases during fetal rat colon morphogenesis. **Develop Growth Differ**, 50,: 41–48, 2008.

LEGALICIER, B.; TRUGNAN, G.; MURPHY, G.; LELONGT, B.; RONCO, P.; Expression of the type collagenase system during mouse kidney development and

tubule segmentation. **J Am Soc Nephrol**, 12: 2358-2369, 2001.

LEBLOND, C. P.; STEVENS, C. E.; The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. **Anat. Rec.** 100:357-71, 1948.

LELONGT, B.; TRUGNAN, G.; MURPHY, G.; RONCO, P.M. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early Stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis *in vitro*. **J Cell Bio**, 136: 1363–1373, 1997.

LINASK, K. K.; HAN, M.; CAI, D. H.; BRAUER, P. R.; MAISASTRY, S. M. Cardiac Morphogenesis: Matrix Metalloproteinase Coordination of Cellular Mechanisms Underlying Heart Tube Formation and Directionality of Looping. **Develop Dyna** 233:739–753, 2005.

LLANO, E.; PENDAS, A.M.; KNAUPER, V.; SORSA, T.; SALO, T.; SALIDO, E.; MURPHY, G.; SIMMER, J.P.; BARTLETT, J.D.; LOPEZ-OTIN, C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20) **Bioche** 36:15101-15108, 1997.

LONGIN, J.; GUILLAUMOT, P.; CHAUVIN, M.; MORERA, A.; MAGUERESSE-BATTISTONI, B. L. MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. **J Cell Science** 114, 2125-2134, 2001.

LIPKIN, M. Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells in normal and disease states. In **Phisio Gastro Tract** (Ed. L.R. Johnson) Raven, New York pp. 145-168, 1981.

LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L.M. Emerging roles of proteases in tumour suppression, **Nat. Rev. Cancer**, 7: 800–808, 2007.

LU, Y.; PAPAGERAKIS, P.; YAMAKOSHI, Y.; HU, J. C.; BARTLETT, J. D.; SIMMER, J. P. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. **Biol. Chem.** 389 695–700, 2008

MCLIN, V.A.; HENNING, S.J.; JAMRICH, M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. **Gastro**, 136: 2074–2091, 2009.

MADARA, J.L.; NEUTRA, M.R.; TRIER J.S. Junctional complexes in fetal rat small intestine during morphogenesis. **Dev Biol** 86:170–178, 1981

MAIORKA, A.; ROCHA, C. Dietas iniciais, desenvolvimento do trato gastrintestinal e impacto sobre a performance de frangos de corte. 2009. Disponível em: <http://www.ihcpoultry.com/IHW_CMS/images/media_files/01_Alex_Maiorka.pdf>. Acesso em 10/08/2012.

MARGAGLIOTTI, S.; CLOTMAN, F.; PIERREUX, C. E.; LEMOINE, P.; ROUSSEAU, P. G.; HENRIET, P.; LEMAIGRE, F. P. Role of metalloproteinases at the onset of liver development. **Develop. Growth Differ.** 50, 331–338, 2008.

MATHAN, M.; MOXEY, P.C.; TRIER, J.S. Morphogenesis of fetal rat duodenal villi. **Am J Anat** 146:73–92, 1976.

MATRISIAN, L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trends Genet** 6:121-125, 1990.

MATSUMOTO, A.; HASHIMOTO, K.; YOSHIOKA, T.; OTANI, H. Occlusion and subsequent re-canalization in early duodenal development of human embryos: integrated organogenesis and histogenesis through a possible epithelial mesenchymal interaction. **Anat Embryol** (Berl) 205:53–65, 2002.

MEIO, B. I.; SIVIERO, I.; FERRANTE, S.M.R.; CARVALHO, J.J. Morphologic study of embryonic development of rat duodenum through a computerized three-dimensional reconstruction: critical analysis of solid core theory. **Pediatr Surg Int** 24:561–565, 2008.

NEUTRA, M. LOUVARD, D. Differentiation of intestinal cells in vitro. **Funct Epith Cells Cultu**, ed. K. S. Matlin, J. D. Valentich New York: Liss, pp. 363-98, 1989.

NISHIDA, Y.; MIYAMORI, H.; THOMPSON, E. W.; TAKINO, T.; ENDO, Y.; SATO, H. Activation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase through an Artificial Receptor for ProMMP-2 Generates Active MMP-2. **Cancer Res**, 68: (21), 2008.

NITSAN, Z. “The Development of Digestive Tract in Posthatched Chicks”. European Symposium on **Poultry Nutri**, Anais. Antalya, 21-28, 1995.

NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. **Poult. Sci.** 80:1490–1495, 2001.

OH, J.; TAKAHASHI, R.; ADACHI, E.; KONDO, S.; KURATOMI, S.; NOMA, A.; ALEXANDER, D. B.; MOTODA, H.; OKADA, A.; SEIKI, M.; ITOH, T.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. **Onco**, 23, 5041–5048, 2004.

OKU, N.; SASABE, E.; UETA, E. Tight Junction Protein Claudin-1 Enhances the Invasive Activity of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by promoting leavage of Laminin-5 g2 Chain via Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and Membrane-Type MMP-1. **Cancer Res**, 66:5251-5257, 2006.

OVERALL, C. M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. **Mol. Biotechnol.** 22, 51–86, 2002.

OVERTON, J.; SHOUP, J. Fine structure of cell surface specializations in the maturing duodenal mucosa of the chick. **J Cell Biol.** Volume 21, 1964.

PACHA, J. Development of intestinal transport function in mammals. **Physiol Rev** 80:1633–1667, 2000.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 8, 221–233, 2007.

PASETTO S. Distribuição do EGF, EGFr, TGF- α , IL-1 α e CSF-1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos em condições funcionais de erupção normal e alterada. Estudo imunohistoquímico. [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP, 2005.

PENKOVA, N.I.; BALTADJIEV, G.A.; KOEVA, Y.A.; ATANASSOVA, P.K.; ANDONOV, V.N.; TRICHKOVA, V.A. Prenatal and postnatal differentiation of the small intestine in rat. **Folia Med (Plovdiv)**, 52: 54-62, 2010.

PINCHUK, V.; MIFFLIN, R.C.; SAADA, J.I.; POWELL, D.W. Intestinal mesenchymal cells. **Curr Gastroenterol Rep**, 12:310–318, 2010.

PLAGEMAN, T.F.; ZACHARIAS, A.L.; GAGE, P.J.; LANG, R.A. Shroom3 and a Pitx2-N-cadherin pathway function cooperatively to generate asymmetric cell shape changes during gut morphogenesis. **Dev Biol.** Sep 1; 357(1):227-34, 2011.

QIU, W.; BAI, S. X.; ZHAO, M. R.; WU, X. Q.; ZHAO, Y. G.; SANG, Q. X.; WANG, Y. L. Spatiotemporal expression of matrix metalloproteinase-26 in human placental trophoblasts and fetal red cells during normal placentation. **Biol. Reprod.** pp .954–959- 72, 2005.

QUARONI, A. Fetal characteristics of small intestinal crypt cells Proc. Nati. Acad. Sci. USA. **Cell Biology**. Vol. 83, pp. 1723-1727, March 1986

SAOTOME, I; CURTO, M., MCCLATCHEY, A.I. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. **Dev.Cell**, 6: 855-864, 2004.

SHIBAYAMA, T.; CARBONI, J. M.; MOOSEKER, M. S. Assembly of the Intestinal Brush Border: Appearance and Redistribution of Microvillar Core Proteins in Developing Chick Enterocytes. **J Cell Bio**, Volume 105, 335-344, 1987

SMITH, D. M.; GRASTY, R. C.; THEODOSIOU, N. A.; TABIN, C. J.; NASCONE-YODER, N. M. Evolutionary relationships between the amphibian, avian, and mammalian stomachs. **Evo Develop**, 2:6, 348-359, 2000.

SPENCE, J. R.; LAUF, R.; SHROYER N. F. Vertebrate Intestinal Endoderm Development. **Develop Dyna**, 240:501–520, 2011.

STRACKE, J.O.; HUTTON, M.; STEWART, M.; PENDAS, A.M.; SMITH, B.; LOPEZ-OTIN, C.; MURPHY, G.; KNAUPER, V. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme, **J. Biol. Chem.** 275, pp. 14809–14816, 2000.

TAKINO, T.; WATANABE, W.; MATSUI, M.; MIYAMORI, H.; KUDO, T.; SEIKI, M.; SATO, H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. **Exper Cell Res**, 312, 1381-1389, 2006.

TAKINO I, G.; D'ASCENZO, S.; BORSOTTI, P.; GIAVAZZI, R.; PAVAN, A.; VINCENZA DOLO, V. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle- Associated Components by Endothelial Cells. **Amer J Pat** Vol. 160, No. 2, 2002.

THEODOSIOU, N.A.; TABIN C.J. Wnt signaling during development of the gastrointestinal tract. **Dev Biol** 259: 258-271, 2003.

THOMSON, A.B.; KEELAN, M. The development of the small intestine. **Can J Physiol Pharmacol** 64:13–29, 1986.

TOTH, A. M.; SOHAIL, B. A.; MOBASHERY, A. S.; FRIDMAN, B. R. MT1-MMP shedding involves an ADAM and is independent of its localization in lipid rafts. **Bioch Bioph R Commun**, 350. 377–384, 2007.

TRIER, J.S.; MOXEY, P.C. Morphogenesis of the small intestine during fetal development. **Ciba Found Symp** :3–29, 1979.

UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **J Comp Physiol**, 168: 241±247, 1998.

UNI, Z.; GEYRA, A.; BEN-HUR, H.; SKLAN, D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **Bri Poltry Sci** 41: 544–551, 2000.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, Molecular, and Functional Changes in the Chicken Small Intestine of the Late-Term Embryo. **Poultry Sci** 82:1747–1754, 2003.

UNI, Z.; SMITH, R. H. Embryo physiology during last incubation period and in egg nutrition. **Embryo Develop**, 2011.

VAGNEROVA, R.; KUČERA, T. Rebuilding of rat intestinal mucous epithelium in prenatal ontogenesis. **Biomed. Papers**, 148(2), 253–254, 2004.

VELASCO, G.; CAL, S.; MERLOS-SUÁREZ, A.; FERRANDO, A.A.; ALVAREZ, S.; NAKANO, A.; ARRIBAS, J.; LÓPEZ-OTÍN, C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. **Cancer Res**, 60:877– 882, 2000.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Res**, 2003.

ZITKA, O.; KUKACKA, J.; KRIZKOVA, S.; HUSKA, D.; ADAM, V.; MASARIK, M.; PRUSA, R.; KIZEK, R. Matrix Metalloproteinases **Curr Medi Chemi**, 17, 3751-3768 3751, 2010.

ZUCKER, S.; PEI, D.; CAO, J.; LOPEZ-OTIN, C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Curr. Top. Dev. Biol.** 54, 1-74, 2003.

ZORN, A.M.; WELLS, J.M. Vertebrate endoderm development and organ formation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 25: 221-251, 2009.

WALTHALL, K.; CAPPON, G. D.; HURTT, M. E.; ZOETIS, T. Postnatal Development of the Gastrointestinal System: A Species Comparison. **Wiley-Liss, Inc. Birth Defects Res** (Part B) 74:132–156, 2005.

WERNER, S. R.; DOTZLAF, J. E.; SMITH, R. C.; MMP-28 as a regulator of myelination. **BMC Neurosci**. 9, 83, 2008.

WIDDOWSON, E.M. Development of the digestive system: comparative animal studies. **Am. J Clin. Nutr.** 41(Suppl):384–390, 1985.

WISE GE, LIN F, FAN W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. **Dev Dyn**. 195: 121-126.1992;

YANG, M.; KURKINEN, M. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts: CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. **J Biol Chem**, 273:17893–17900, 1998.

YANG, Y.; ESTRADA, E. Y.; THOMPSON, J. F.; LIU, W. ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. **J C Blo Flow Meta** 27, 697–709, 2007.

YANG, M.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; G, GIBSON. Contrasting expression of membrane metalloproteinases, MT1-MMP and MT3-MMP, suggests distinct functions in skeletal development. **Cell Tissue Res**, 333:81–90. 2008.