

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

NAUANA HAY PAIVA

**O PAPEL DA BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA DURANTE A
MORFOGÊNESE DAS VILOSIDADES INTESTINAIS EM EMBRIÕES DE
GALINHAS**

PONTA GROSSA

2017

NAUANA HAY PAIVA

**O PAPEL DA BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA DURANTE A
MORFOGÊNESE DAS VILOSIDADES INTESTINAIS EM EMBRIÕES DE
GALINHAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Área de
concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Maria Albertina de
Miranda Soares.

Co-orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

PONTA GROSSA

2017

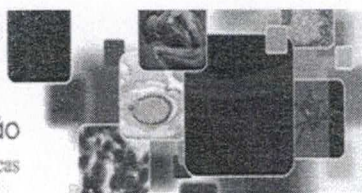
Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Paiva, Nauana Hay
P142 O papel da bifurcação das projeções da
 mucosa durante a morfogênese das
 vilosidades intestinais em embriões de
 galinhas/ Nauana Hay Paiva. Ponta Grossa,
 2017.
 45f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biomédicas - Área de Concentração:
 Biologia Celular e Molecular),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Albertina
 de Miranda Soares.

 1.Galinhas. 2.Bifurcação. 3.Morfogênese
 das vilosidades intestinais.
 4.Proliferação celular. 5.Membrana basal.
 I.Soares, Maria Albertina de Miranda.
 II. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD: 571.86



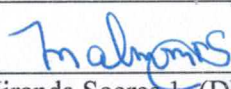
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 07/2017, DA MESTRANDA NAUANA HAY PAIVA REALIZADO NO DIA 07 DE JULHO DE 2017, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos sete dias de julho de dois mil e dezessete, às 13hs30min no auditório da Pós-Graduação de Biologia Evolutiva, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professora Dra. Maria Albertina de Miranda Soares** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Nauana Hay Paiva** na linha de pesquisa; Biologia do Desenvolvimento e de Processos Patológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Rafael Bertoni da Silveira (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Claudia Feijó Ortolani - Machado (UFPR/Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“O Papel Da Bifurcação Das Projeções Da Mucosa Durante A Morfogênese Das Vilosidades Intestinais Em Embriões De Galinhas.”** Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovada considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

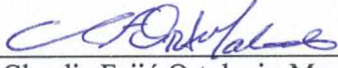
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Maria Albertina de Miranda Soares 1- (DEBIOGEM - UEPG)- Presidente


Rafael Bertoni da Silveira 2- (DEBIOGEM - UEPG) – Titular


Claudia Feijó Ortolani - Machado 3- (UFPR - Pr) – Titular

Ponta Grossa, 07 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e discernimento para fazer as escolhas corretas durante essa caminhada.

À minha querida orientadora, Profa Dra. Maria Albertina de Miranda Soares, que com inteligência e dedicação me proporcionou grande aprendizado.

Ao meu estimado co-orientador, Prof. Dr. José Rosa Gomes, pelos ensinamentos diários e auxílio na execução do projeto.

À querida Profa. Dra. Maria Marta Loddi por todo suporte e ensinamentos que foram essenciais para a execução desse trabalho.

À minha família por me incentivar e apoiar em todos os momentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pelo apoio e momentos compartilhados.

Ao Bruno Hartmann e Yasmim Fidler pelas contribuições que trouxeram ao trabalho.

Ao professor Dr. Fábio André dos Santos pelas sugestões que auxiliaram na execução do trabalho.

RESUMO

PAIVA, Nauana Hay. **O papel da bifurcação das projeções da mucosa durante a morfogênese das vilosidades intestinais em embriões de galinhas**. 2017. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

As vilosidades intestinais são estruturas digitiformes da camada mucosa do intestino delgado que ampliam a superfície desse órgão, otimizando o processo de absorção dos nutrientes. A morfogênese das vilosidades intestinais ocorre de forma indireta em galinhas. Primeiramente, surgem projeções longitudinais da mucosa. Essas projeções sofrem dobramento e adquirem padrão zigue-zague, que é a base para a formação das vilosidades. Estudo anterior do nosso grupo relatou pela primeira vez que as projeções da mucosa de embriões de galinhas se bifurcavam. Entretanto, embora vários aspectos morfológicos da morfogênese das vilosidades intestinais de galinhas sejam conhecidos, não há na literatura dados a respeito da bifurcação das projeções da mucosa. O objetivo do presente trabalho foi compreender o papel da bifurcação na morfogênese das vilosidades intestinais no jejuno de embriões de galinhas. Análises histológicas, avaliação da proliferação celular pela incorporação de BrdU e reação de PAS foram realizadas durante o período de ocorrência da bifurcação. Para avaliar a proliferação celular, a injeção de BrdU *in ovo* foi padronizada. As análises histológicas permitiram estabelecer que a bifurcação ocorre entre o 13º e 15º dia e definir a sequência de mudanças morfológicas do processo. A avaliação da proliferação celular mostrou que as células do epitélio da mucosa e as envolvidas no processo de bifurcação estavam proliferando. A reação de PAS revelou a presença de membrana basal nas células envolvidas na bifurcação. Os dados permitem concluir que o processo de bifurcação envolve mudanças morfológicas correlacionadas à proliferação de células epiteliais que culminam com a formação das pré-vilosidades.

Palavras-chave: galinhas, bifurcação, morfogênese das vilosidades intestinais, proliferação celular, membrana basal.

ABSTRACT

PAIVA, Nauana Hay. **The role of the bifurcation of the previllous ridges during intestinal villi morphogenesis of the chick embryo.** 2017. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017

The intestinal villi are finger-like projections of the small intestinal mucosa that extend its surface, optimizing the process of nutrient absorption. The intestinal villi morphogenesis of the chick occurs indirectly. At first, longitudinal previllous ridges appear in the intestine. The previllous ridges fold into zigzag pattern, and finally individual villi are formed. Our previous study reported, for the first time, the bifurcation of the previllous ridges on chick embryos. Although morphological aspects of the intestinal villi morphogenesis of the chickens are known, there are no data from the previllous ridges bifurcation. The present work aimed to understand the role of bifurcation in the intestinal villi morphogenesis of the chick embryos. Histological analysis, evaluation of cell proliferation by incorporation of BrdU and PAS reaction were performed during the period of bifurcation. To evaluate cell proliferation, injection of BrdU *in ovo* was standardized. The histological analyses allowed to establish that the bifurcation occurs between the 13th and 15th day and to define the sequence of morphological events during the process. The evaluation of cell proliferation showed that cells of the mucosal epithelium and involved in the bifurcation were proliferating. The PAS reaction revealed the presence of basement membrane in the cells involved in the bifurcation process. The data allow us to conclude that the morphological changes of the bifurcation are correlated to the proliferation of epithelial cells and culminate to formation of previllous.

Keywords: chick, bifurcation, villi morphogenesis, cell proliferation, basement membrane.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Anatomia e função do sistema digestório de aves	9
2.2	Histologia do intestino delgado de aves	10
2.3	Desenvolvimento embrionário do intestino de aves	13
2.3.1	Origem embriológica do intestino	13
2.3.2	Aspectos morfológicos do desenvolvimento do intestino delgado	15
2.3.3	Morfogênese das vilosidades intestinais	16
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Animais	22
4.2	Análise morfológica do jejuno de embriões de galinhas para delimitar o período de ocorrência da bifurcação das projeções da mucosa intestinal	23
4.2.1	Estágios embrionários	23
4.2.2	Processamento histológico	23
4.3	Padronização da injeção de 5 – bromo - 2'- deoxiuridina (BrdU) <i>in ovo</i> para avaliar a proliferação celular durante o processo de bifurcação das projeções da mucosa	24
4.3.1	Via de injeção de BrdU	24
4.3.2	Determinação da concentração mínima de BrdU para a marcação das células em processo de proliferação	24
4.3.3	Sobrevivência e desenvolvimento dos embriões após injeção de BrdU	25

4.4	Descrição morfológica e avaliação da proliferação celular (marcação por brdu) durante o processo de bifurcação das projeções da mucosa	25
4.4.1	Injeção intra-ovo	25
4.4.2	Imunohistoquímica	26
4.5	Origem das células envolvidas no processo de bifurcação das projeções da mucosa: marcação da membrana basal pela reação de pas (ácido periódico de Schiff)	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Período de ocorrência da bifurcação das projeções da mucosa	28
5.2	Padronização da injeção de BrdU <i>in ovo</i>	30
5.3	Bifurcação das projeções da mucosa: aspectos morfológicos e avaliação da proliferação celular	32
5.4	A característica epitelial das células envolvidas no processo de bifurcação das projeções da mucosa	35
6	DISCUSSÃO	36
6.1	Padronização da injeção de BrdU <i>in ovo</i>	36
6.2	Formação das pré-vilosidades no jejuno de embriões de galinhas a partir da bifurcação das projeções da mucosa	36
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O intestino delgado é 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.

Do ponto de vista morfológico, o intestino delgado é dividido em três regiões: duodeno, jejuno e íleo. Essas regiões são formadas por quatro camadas histológicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, que se conectam por meio do tecido conjuntivo e pelos elementos neurais e vasculares.

A camada mucosa do intestino delgado apresenta longas projeções digitiformes, denominadas de vilosidades. As vilosidades são de crucial importância para o funcionamento do intestino, uma vez que ampliam a sua superfície, aumentando a absorção de água, íons e nutrientes provenientes dos alimentos.

Em galinhas, as vilosidades intestinais não são formadas diretamente da mucosa lisa, como em mamíferos, mas sim a partir de projeções dessa camada que apresentam um arranjo em zigue-zague. Essas projeções dão origem a estruturas individuais, longas e digitiformes, que são as vilosidades propriamente ditas.

Camargo et al. (2016) observaram pela primeira vez que as projeções da mucosa em embriões de galinhas se bifurcavam e sugeriram que esse processo poderia ter papel na morfogênese das vilosidades.

Embora vários aspectos da morfogênese das vilosidades intestinais de galinhas sejam conhecidos, não há na literatura dados suficientes a respeito da bifurcação das projeções da mucosa, não sendo, portanto, compreendido o seu papel nesse processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANATOMIA E FUNÇÃO DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE AVES

O sistema digestório de aves é altamente adaptado para a ingestão, trituração, digestão, absorção de nutrientes e eliminação de excretas, liberando rapidamente energia para manter a alta taxa metabólica desses animais (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Anatomicamente, o sistema digestório de aves é composto pela orofaringe, esôfago, estômago, fígado, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso e cloaca (Fig. 1). A orofaringe é a cavidade que se estende do bico até a entrada do esôfago, possuindo uma camada dispersa de glândulas salivares que produzem secreção mucoide que lubrifica o alimento. A parede da orofaringe é preenchida por papilas mecânicas, que auxiliam no movimento do bolo alimentar em direção ao esôfago. Além de diferenças na orofaringe em comparação com mamíferos, como presença de bico e ausência de dentes, as aves apresentam ainda peculiaridades na anatomia do esôfago e estômago. O esôfago apresenta uma expansão na parede ventral, na entrada do tórax, denominada de papo ou inglúvio, que é responsável pelo estoque de alimento por um curto período de tempo. No esôfago e papo a atividade química é quase inexistente, exceto pela presença da amilase salivar que inicia o processo de digestão de carboidratos. No esôfago há diversas glândulas mucosas cuja secreção auxilia a passagem do bolo alimentar. O estômago é dividido por uma constrição (istmo) em uma parte glandular, denominada de proventrículo, e uma parte muscular, denominada de moela. No proventrículo há células produtoras de ácido clorídrico, pepsinogênio e muco. A moela não possui glândulas e tem como função a trituração dos alimentos e digestão de proteínas. O intestino delgado compreende a porção mais longa do sistema digestório, sendo dividido em duodeno, jejuno e íleo, e é responsável pela finalização da digestão e absorção dos nutrientes provenientes dos alimentos. O duodeno é constituído por uma porção proximal descendente e uma distal ascendente, na qual abrem-se ductos que conduzem a bile e o suco pancreático, secretados, respectivamente, pelo fígado e pâncreas. O jejuno é o segmento mais longo e tem a forma de alças espiraladas ao longo do mesentério. Em sua porção final é observada uma

pequena protuberância denominada de divertículo de Meckel, que demarca a conexão que existiu com o saco vitelino. O íleo apresenta uma longa parte ascendente e uma curta parte descendente que se comunica com o intestino grosso. Anexo ao intestino delgado encontram-se o pâncreas e o fígado. O pâncreas das aves, similar ao de mamíferos, apresenta tanto função autócrina, liberando as enzimas digestivas, como endócrina, liberando hormônios como insulina e glucagon. O fígado é responsável pela produção da bile que age na emulsificação de lipídios e desempenha importante função na metabolização de nutrientes e produção de fatores de coagulação sanguínea. O intestino grosso compreende os cecos e cólon. Os cecos são bolsas de paredes finas que abrigam a microbiota anaeróbia responsável pela fermentação. O cólon tem como função a absorção de água e eletrólitos por movimentos antiperistálticos. A cloaca é uma estrutura dilatada, em formato de bolsa, que é um receptáculo comum do aparelho urogenital e reprodutor (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002; DIBNER; RICHARDS, 2004; DYCE; SACK; WENSING, 2010).

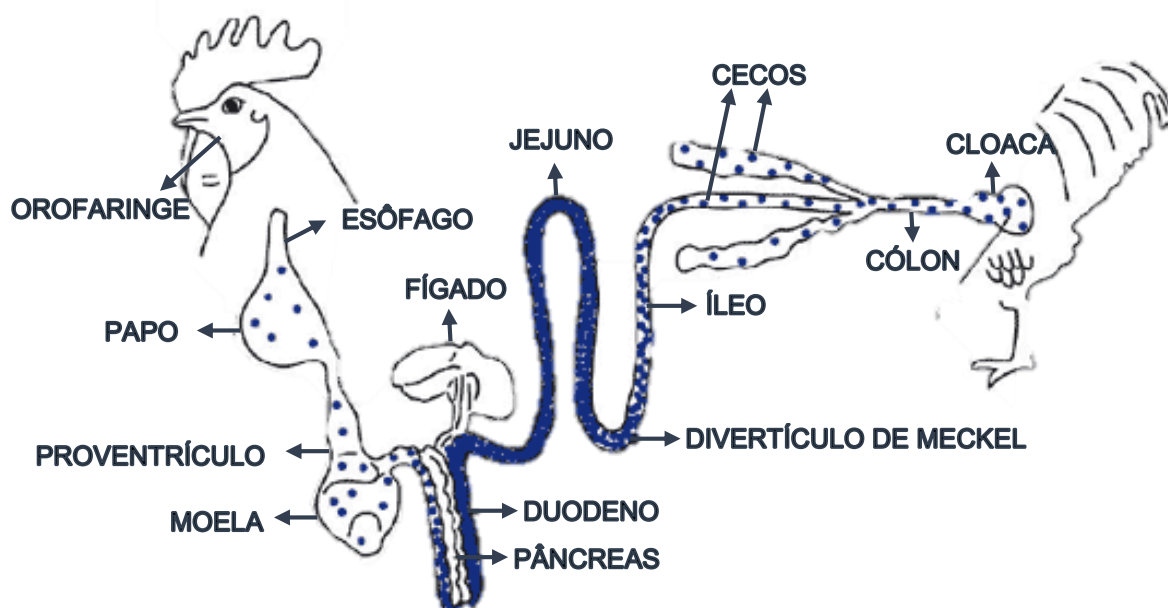


Figura 1 – Esquema da anatomia do sistema digestório de aves. FONTE: Simon; Versteeg (1989).

2.2 HISTOLOGIA DO INTESTINO DELGADO DE AVES

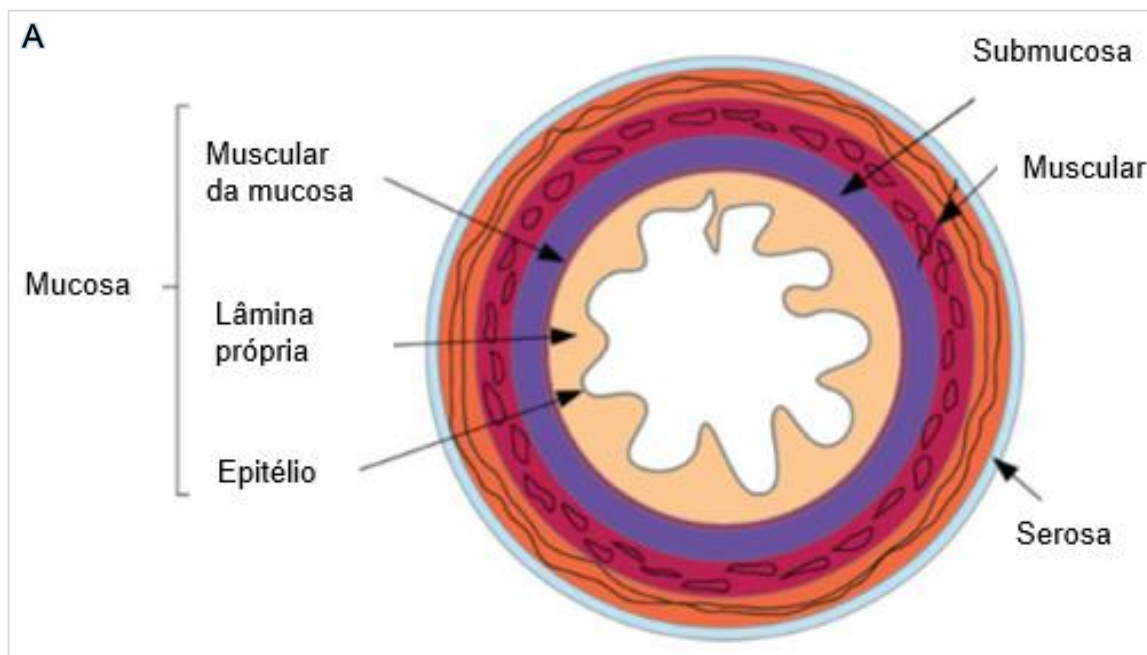
O intestino delgado é responsável pela finalização da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção de hormônios, sendo indispensável para a manutenção das atividades metabólicas dos seres vivos.

De acordo com suas funções e organização é considerado um órgão evolutivamente conservado em vertebrados. Entretanto, há grandes variações estruturais nas camadas que o compõem e na organização da mucosa. Por exemplo, as pregas longitudinais características de peixes adultos, anfíbios e répteis, são substituídas por vilosidades em aves e mamíferos, embora ambas estejam relacionadas com a mesma função, que é o aumento da superfície de absorção. Além das vilosidades, aves e mamíferos têm como característica comum a presença dos mesmos tipos celulares epiteliais e das criptas. As aves, entretanto, não apresentam uma distinção histológica entre o jejuno e o íleo como observada em outros vertebrados (DAUÇA et al., 1990; SMITH et al., 2000; DIBNER; RICHARDS, 2004).

O intestino delgado de aves é formado por quatro camadas com estrutura e funções distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Fig. 2), que estão conectadas por tecido conjuntivo, elementos neurais e vasculares.

A mucosa é a camada mais interna e é estruturalmente e funcionalmente mais complexa e importante. É composta por tecido epitelial de revestimento, lâmina própria e muscular da mucosa. A mucosa forma invaginações, denominadas de criptas (glândulas de Lieberkühn), que se aprofundam na lâmina própria até a muscular da mucosa, e longas projeções digitiformes, denominadas de vilosidades. As vilosidades são extremamente importantes para a função do intestino, uma vez que ampliam a sua superfície, aumentando a absorção de água, íons e nutrientes provenientes dos alimentos. O epitélio de revestimento da mucosa é do tipo colunar simples e é constituído pelos enterócitos, que são as células absorptivas; pelas células caliciformes, secretoras de muco; e pelas células enteroendócrinas, que secretam hormônios peptídicos relacionados com a regulação da digestão. Na base das criptas são encontradas as células de defesa, conhecidas como células de Paneth, que regulam a microbiota intestinal. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, nódulos linfáticos e matriz extracelular. A muscular da

mucosa é responsável pela movimentação rítmica das vilosidades, que é importante para a absorção dos nutrientes. A submucosa é composta por vasos linfáticos, pelo plexo nervoso submucoso e por ramificações de elementos vasculares. Os nódulos linfáticos são abundantes no íleo e o seu conjunto é denominado de placa de Peyer. Recobrendo as placas de Peyer estão as células M (microfold), que são enterócitos especializados na captação de antígenos da luz do intestino por endocitose e seu transporte para os macrófagos e linfócitos T. A muscular própria é constituída por duas subcamadas de músculo liso: a circular (interna) e a longitudinal (externa). Entre essas duas camadas há o plexo nervoso mioentérico que controla o peristaltismo. A serosa é o revestimento externo do intestino delgado e é formada por um epitélio simples pavimentoso (mesotélio) e tecido conjuntivo frouxo. A camada serosa forma uma barreira natural contra a disseminação de processos inflamatórios e malignos (SMITH et al., 2000; RAO; WANG, 2010; BALBI; CIARLETTA, 2013).



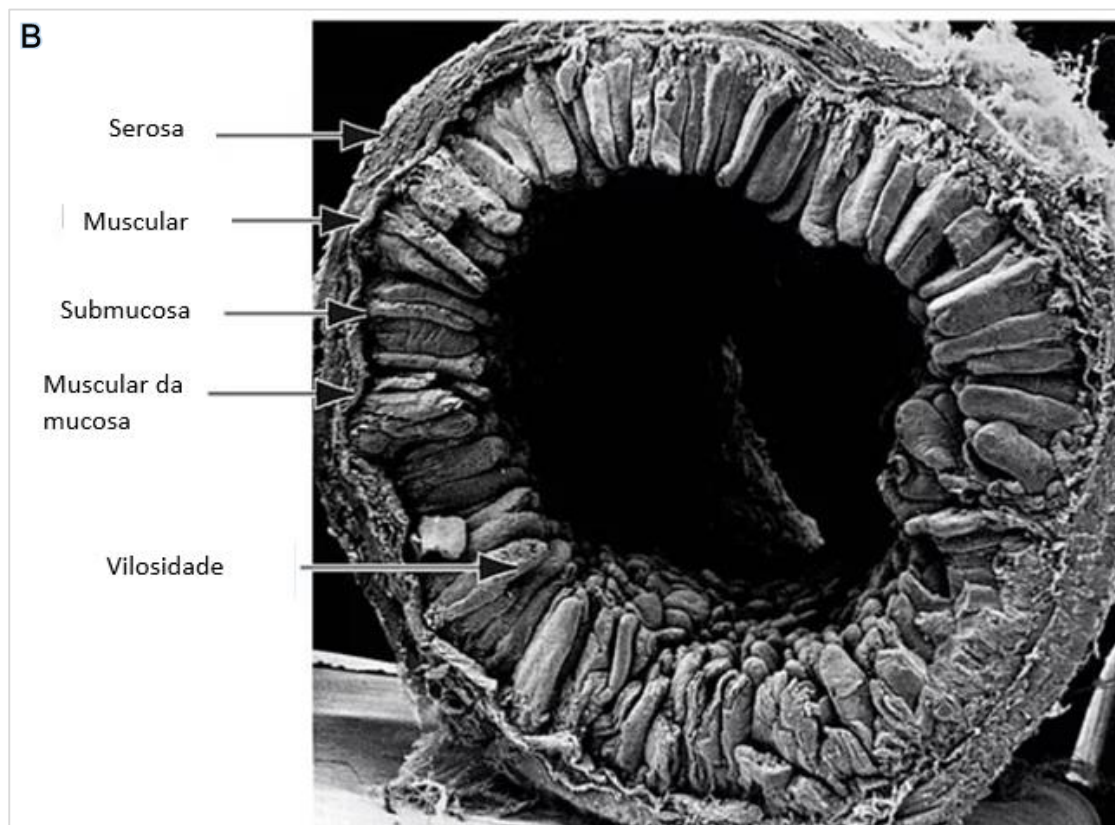


Figura 2 – A) Desenho esquemático representando as camadas do intestino delgado de aves. Fonte: BALBI; CIARLETTA (2013); **B)** Fotomicroscopia eletrônica de varredura do intestino delgado de aves representando suas camadas histológicas. FONTE: <http://veterinandoufpa.com/anatomia>

2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO TRATO GASTROINTESTINAL DE AVES

2.3.1 Origem embriológica do intestino

A origem embriológica do trato gastrointestinal é semelhante entre aves e mamíferos e tem início com a formação de invaginações da endoderme nas extremidades anterior e posterior do embrião, denominadas, respectivamente, de AIP (Portal intestinal anterior) e CIP (Portal intestinal caudal). Essas invaginações se estendem em direção à linha mediana do embrião e fundem-se. Concomitantemente, há o dobramento ventral da endoderme lateral, levando à formação do trato gastrointestinal circundado pelo mesoderme (Fig. 3). Esse processo ocorre entre o segundo e terceiro dia de incubação (HIRAMATSU; YASUGI, 2004). Na região do intestino primitivo, a endoderme dará origem ao

epitélio da mucosa, enquanto que a mesoderme originará o mesênquima e o músculo liso, dentre outros tipos celulares. O intestino primitivo dá origem a outros órgãos, como, por exemplo, o fígado e pâncreas. No sexto dia de incubação, a alça duodenal e os cecos são observados. Nesse período, o intestino médio é aberto e encontra-se ligado ao vitelo via divertículo de Meckel, de maneira que as paredes do saco vitelino e do intestino são contínuas. Ao décimo quarto dia de incubação ocorre a introdução do intestino na cavidade abdominal e no décimo sétimo dia ocorre a abertura do divertículo de Meckel e tem início a incorporação do saco vitelino na cavidade abdominal. Na eclosão, o intestino continua ligado ao saco vitelino por meio do pedículo vitelino e o seu conteúdo é absorvido pela mucosa intestinal. Durante todo o período embrionário imunoglobulinas, lipídeos e vitaminas lipossolúveis do vitelo, que suprem as necessidades calóricas e modulam a resposta imune do embrião são liberadas na corrente sanguínea via saco vitelino (BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003; DIBNER; RICHARDS, 2004; VAN DEN BRINK, 2007; MCLIN; HENNING; JAMRICH, 2009; TAVERNARI; MENDES, 2009; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011; SPENCE et al., 2016).

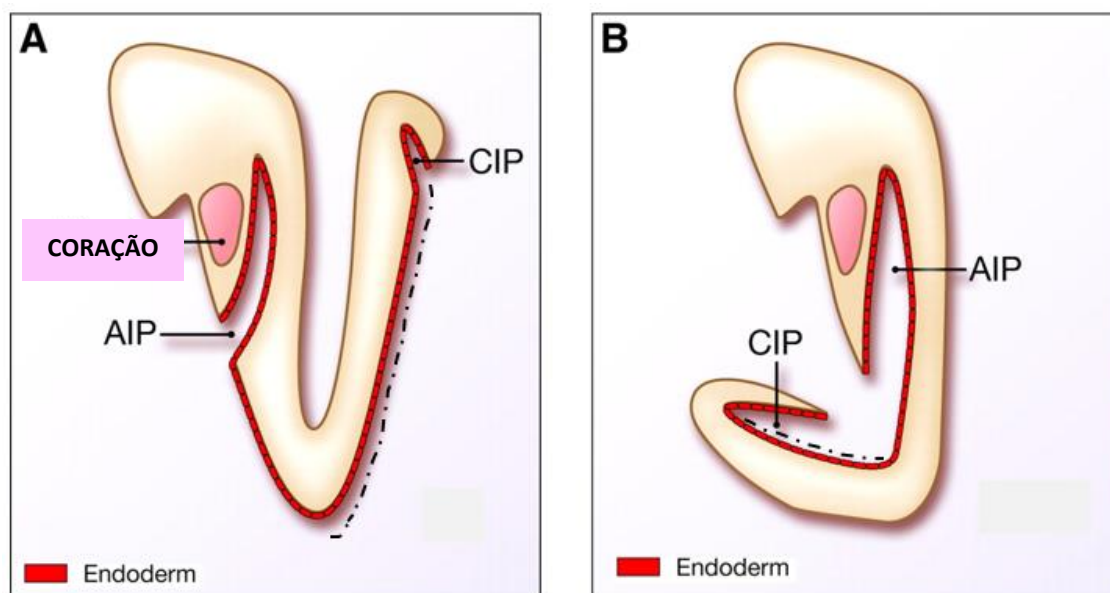


Figura 3 - Desenho ilustrando a formação do trato gastrointestinal. **A**- Formação de invaginações da endoderme nas extremidades anterior e posterior do embrião, respectivamente, denominadas de AIP (Portal intestinal anterior) e CIP (Portal intestinal caudal). A extremidade ventral do embrião está orientada para o exterior (região tracejada). **B** - Após o dobramento, a extremidade ventral do embrião se volta para o interior (região tracejada), aproximando o AIP do CIP. As invaginações se fundirão levando à formação do trato gastrointestinal circundado pela mesoderme. Fonte: VAN DEN BRINK (2007)

2.3.2 Aspectos morfológicos do desenvolvimento do intestino delgado

Em galinhas, no terceiro dia de incubação, o intestino delgado é dividido em anterior, médio e grosso. Os primeiros eventos de diferenciação do intestino delgado são observados no duodeno e, posteriormente, nas demais regiões. Os eventos ocorrem na forma de onda e estão correlacionados temporalmente e espacialmente com a diferenciação das camadas musculares. No quarto dia, o duodeno é um tubo circular com um pequeno lúmen. A parede do duodeno é constituída de uma camada externa de mesotélio (a serosa), uma camada intermediária de mesênquima e uma camada interna de epitélio pseudoestratificado (Fig.4A). Do quarto dia ao oitavo dia, o duodeno torna-se elíptico e o lúmen é mais amplo. O número de células da camada epitelial aumenta e o mesênquima passa a ter uma orientação circunferencial. No oitavo dia uma camada de músculo liso se diferencia a partir de células mesenquimais e se dispõe de maneira circular (Fig.4B). Nesse período, o mesênquima tem orientação longitudinal e está localizado em ambos os lados da camada muscular circular. A submucosa é formada de células mesenquimais organizadas de maneira compacta. No décimo primeiro dia, a mucosa é revestida por epitélio colunar simples. No décimo terceiro dia, é formada uma camada de músculo liso orientada longitudinalmente externa à camada muscular circular (camada muscular). No décimo sexto dia é formada uma camada muscular longitudinal interna à camada muscular circular (muscular da mucosa). A associação das células mesenquimais na submucosa torna-se frouxa. No décimo nono e vigésimo dia a submucosa tem aparência condensada. Até o momento da eclosão o crescimento e maturação da mucosa intestinal amplia a área de absorção em cerca de 5 vezes. As criptas são formadas a partir da eclosão até 2 a 3 dias do nascimento e a maturidade funcional do intestino é aumentada durante as primeiras semanas do nascimento (COULOMBRE e COULOMBRE, 1958; HAYES, 1965; BURGESS, 1975; UNI et al., 2003; SHYER et al., 2014).

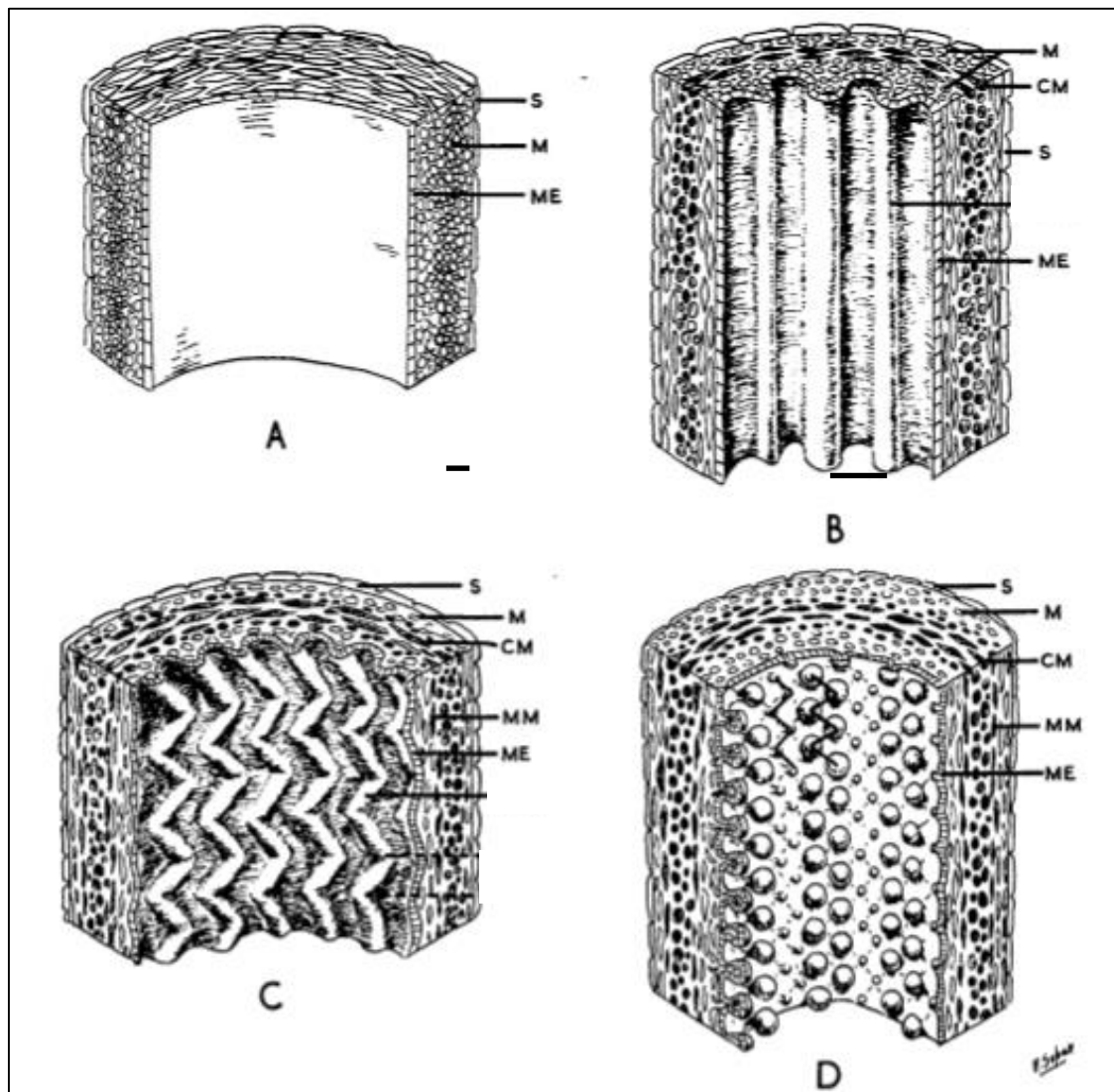


Figura 4- Desenhos esquemáticos mostrando a morfologia do intestino delgado durante o desenvolvimento embrionário de galinhas. **A-** 6 dias de incubação: o intestino delgado é revestido internamente por um epitélio pseudoestratificado (ME) e externamente pela camada serosa (S), entre essas há uma camada intermediária de mesênquima (M); **B-** 9 dias de incubação: ocorre a diferenciação de uma camada de músculo liso de orientação circular (CM). Em ambos os lados da CM há mesênquima orientado longitudinalmente (M); **C-** 13 dias de incubação: epitélio de revestimento interno do tipo colunar simples. Diferenciação de uma camada de músculo liso longitudinal (MM) externa à CM. **D-** 18 dias de incubação: diferenciação da camada muscular longitudinal (MM) interna à CM. Fonte: COULOMBRE; COULOMBRE (1958).

2.3.3 Morfogênese das vilosidades intestinais

A morfogênese das vilosidades intestinais em vertebrados envolve alterações morfológicas drásticas que ainda não são plenamente compreendidas. Embora a morfogênese das vilosidades intestinais apresente

estágios similares entre os vertebrados, os aspectos morfológicos que levam à sua formação são distintos entre esses animais. Exemplo disso são as diferenças observadas entre camundongos e galinhas. Em camundongos, as vilosidades são formadas diretamente de uma mucosa lisa e em galinhas são formadas a partir de projeções da mucosa com arranjo zigue-zague (Fig. 5). Em humanos, porcos e ratos o processo de formação das vilosidades é similar ao de camundongos, o que demonstra que há pelos menos dois modos de formação dessas estruturas em vertebrados (WALTON et al., 2016 a, b).

A morfogênese das vilosidades intestinais em galinhas compreende três estágios: 1º) formação de projeções (precursoras das vilosidades); 2º) delineamento das vilosidades; 3º) crescimento das vilosidades (GREY, 1972). Até o oitavo dia de incubação, a mucosa é lisa. No oitavo dia tem início o primeiro estágio da morfogênese das vilosidades com a formação de projeções da mucosa ao longo do intestino delgado (precursoras das vilosidades). O número dessas projeções aumenta progressivamente em um período de 24-36h. Do décimo terceiro ao décimo sétimo dia ocorre o segundo estágio com as células epiteliais tornando-se mais altas e a mucosa apresentando muitas projeções com tamanho uniforme, que sofrem um dobramento, estabelecendo um zigue-zague irregular. O interior dessas projeções é constituído de lâmina própria condensada. No décimo sétimo dia as projeções estão longitudinalmente maiores e apresentam a base mais ampla, passando a apresentar um padrão zigue-zague regular, que constitui a estrutura básica para o desenvolvimento das vilosidades. No décimo oitavo dia tem início o terceiro estágio com a formação das vilosidades propriamente ditas que são estruturas individuais, longas e digitiformes. O interior das vilosidades é constituído de lâmina própria condensada e vasos sanguíneos. No vigésimo primeiro dia, as vilosidades são mais longas (COULOMBRE e COULOMBRE, 1958; HAYES, 1965; GREY, 1972; SABATAKOU et al., 2003; WALTON et al., 2016 a, b).

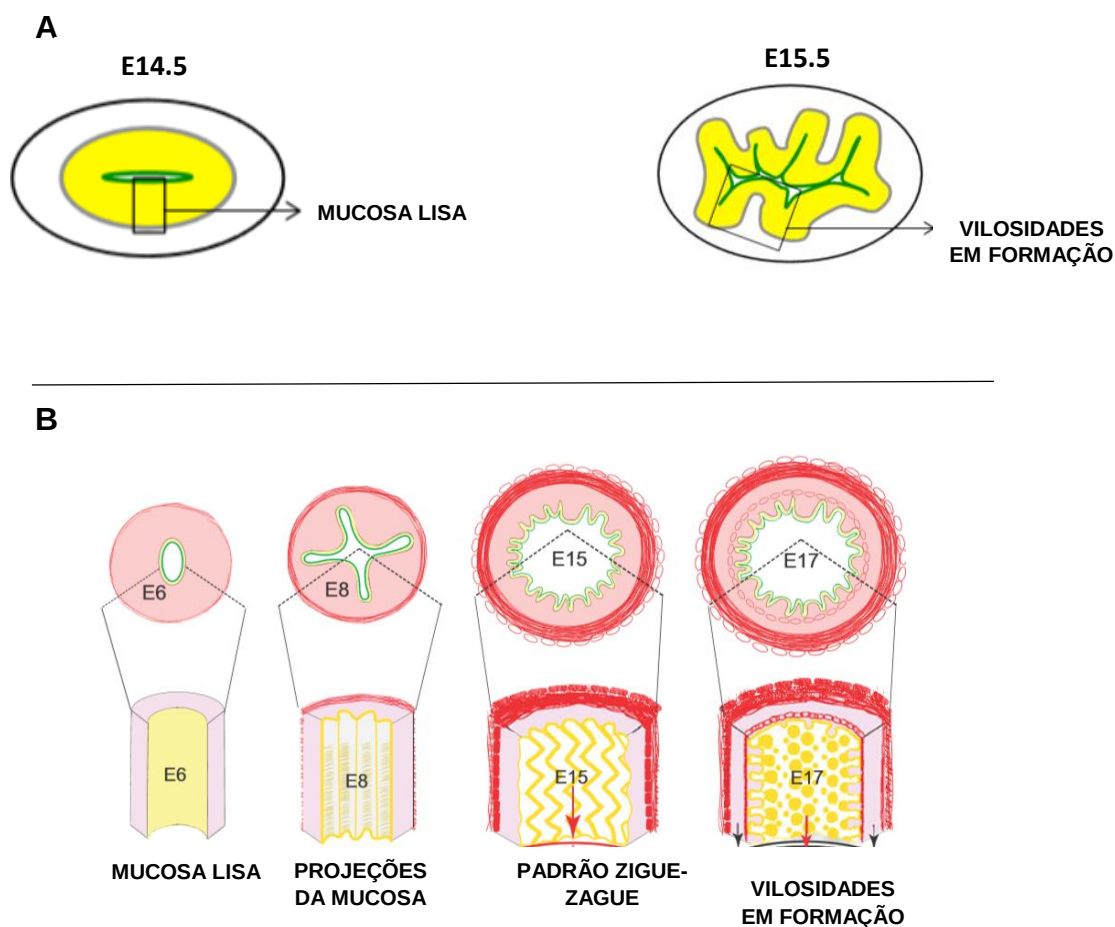


Figura 5- Esquema mostrando a diferença entre a morfogênese das vilosidades intestinais em camundongos (A) e galinhas (B). **A-** Em camundongos as vilosidades surgem diretamente da mucosa lisa (E14.5 – E15.5). **B-** Em galinhas as vilosidades surgem a partir de projeções da mucosa com padrão zigue-zague (E6-E17). E14.5 e E15.5 – estágios do desenvolvimento embrionário de camundongo. E6, E8, E15 e E17 – 6, 8, 15 e 17 dias de incubação de embriões de galinhas, respectivamente. Fonte: WALTON (2016 b).

Camargo et al. (2016), estudando o papel da metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP) no desenvolvimento do intestino delgado de vertebrados durante o período embrionário e pós-natal, relataram, pela primeira vez, a presença de um cordão de células no interior da lâmina própria das projeções da mucosa, em embriões de galinhas com 16 dias de incubação, o qual não foi observado em embriões de ratos. Devido ao fato das células desse cordão se mostrarem morfológicamente semelhantes a do epitélio da superfície da mucosa (Fig. 6), sugeriu-se que essas teriam origem desse

tecido. Os autores observaram que as projeções da mucosa se bifurcavam e sugeriram que esse processo teria papel significativo na formação das vilosidades.

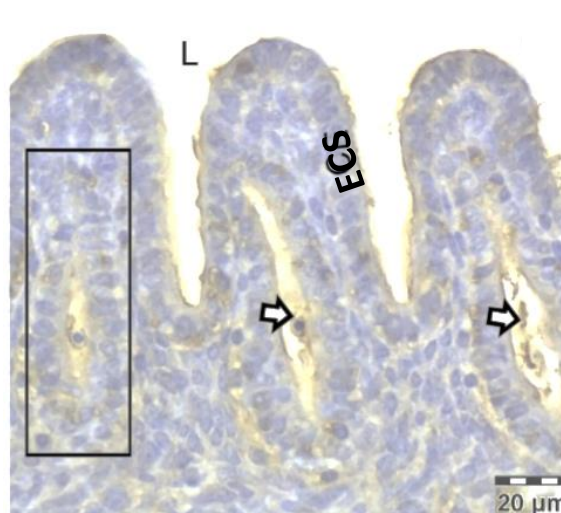


Figura 6- Fotomicrografia do duodeno de embriões de galinhas com 16 dias de incubação. Cordão de células (retângulo) no interior da lâmina própria e lúmen secundário (setas) L: Lúmen principal; ECS: Epitélio colunar simples. Fonte: CAMARGO et al. (2016)

A morfogênese das vilosidades intestinais em galinhas não pode ser explicada por um único mecanismo e vários autores trouxeram contribuições ao longo dos anos para esclarecer esse processo.

Coulombre e Coulombre (1958) sugeriram que a contração da camada muscular circular causa a formação das projeções da mucosa por forçar o epitélio a dobrar, enfatizando o papel de fatores extrínsecos à camada epitelial na morfogênese das vilosidades intestinais de galinhas.

Diferentemente, Burgess (1975) enfatizou o papel de fatores intrínsecos da camada epitelial, sugerindo que a contração de microfilamentos tem papel na morfogênese das vilosidades intestinais.

Estudos recentes usando modelos matemáticos baseados nas propriedades morfo-elásticas dos tecidos em desenvolvimento indicam que propriedades geométricas e elásticas da mucosa têm forte influência na formação das projeções, demonstrando que a emergência dessas estruturas é

resultado de um crescimento volumétrico diferencial entre o epitélio da mucosa e os tecidos subjacentes (BALBI E CIARLETTA, 2013; AMAR E JIA, 2013).

Mais recentemente, Shyer et al. (2014) revelaram que o surgimento das projeções da mucosa, o estabelecimento do padrão zigue-zague e a formação das vilosidades correlacionam com o desenvolvimento sequencial das camadas de músculo liso e demonstraram que essas agem como barreira para a expansão da endoderme e do mesênquima, comprimindo essas camadas circunferencialmente para formar as projeções, depois longitudinalmente para gerar o padrão zigue-zague e, por último, longitudinalmente para formar as vilosidades. Em camundongos, as camadas musculares se diferenciam mais rápido, aproximadamente em 48h, e não há a formação de uma camada muscular longitudinal interna, o que pode explicar as diferenças no processo de morfogênese das vilosidades entre esses animais.

Em relação ao processo de proliferação celular durante a morfogênese das vilosidades intestinais em vertebrados, há poucos relatos na literatura.

Em camundongos, alta taxa de proliferação é observada no epitélio pseudoestratificado antes do início da formação das vilosidades. Quando o epitélio pseudoestratificado é reorganizado em um epitélio colunar simples, e tem início a formação das vilosidades, a proliferação aumenta nas células epiteliais da base dessas estruturas. Mais tarde, a proliferação torna-se restrita ao epitélio da região entre as vilosidades e, posteriormente, às células das criptas (GROSSE et al., 2011; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011; SPENCE et al, 2016).

Ozaydin e Celik (2012) observaram proliferação no epitélio das projeções da mucosa, tecido conjuntivo, e nas camadas musculares em embriões de galinhas com 11 dias de incubação. Com 20 e 21 dias de incubação a proliferação diminuiu no tecido conjuntivo e músculo, mas foi mantida na maioria das células epiteliais ao longo das vilosidades.

Mais recentemente, Shyer et al. (2014) observaram em cortes transversais do intestino de embriões de galinhas células proliferando uniformemente no epitélio e mesênquima no estágio de estabelecimento do padrão zigue-zague.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender o papel da bifurcação das projeções da mucosa na morfogênese das vilosidades intestinais no jejuno de embriões de galinhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar histologicamente o jejuno de embriões de galinhas para delimitar o período de ocorrência do processo de bifurcação das projeções da mucosa;
- Padronizar a injeção de BrdU *in ovo*;
- Descrever os aspectos morfológicos do processo de bifurcação das projeções da mucosa;
- Avaliar a proliferação celular durante o processo de bifurcação das projeções da mucosa através da marcação de BrdU;
- Investigar a origem das células envolvidas no processo de bifurcação das projeções da mucosa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Ovos fertilizados de galinhas, *Gallus gallus domesticus* (LINNAEUS 1758), de 10 dias de incubação foram obtidos de Matriseiro Industrial Idôneo, situado na cidade de Carambeí, PR. Após higienização com hipoclorito de sódio comercial, os ovos foram mantidos em incubadora (IP 70 Premium Ecológica), com temperatura constante de 37,8⁰C e umidade de 60%, com motor de viragem ligado, no Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), até o momento do sacrifício dos animais.

Os experimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética Animal – CEUA – da Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa - PR (Protocolo CEUA/UEPG – 7491/2015).

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO JEJUNO DE EMBRIÕES DE GALINHAS PARA DELIMITAR O PERÍODO DE OCORRÊNCIA DO PROCESSO DE BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

4. 2.1 Estágios embrionários

Baseando-se nos dados de Camargo et al. (2016), embriões nos seguintes tempos do desenvolvimento foram analisados histologicamente: Tempo 1: 12 dias de incubação; Tempo 2: 13 dias de incubação; Tempo 3: 14 dias de incubação; Tempo 4: 15 dias de incubação; Tempo 5: 16 dias de incubação; Tempo 6: 17 dias de incubação. Para cada tempo foram utilizados 3 animais. Os ovos foram abertos por meio da remoção da casca na região da câmara de ar e os embriões foram removidos. O sacrifício foi realizado através

do deslocamento crânio-cervical e após a morte os animais foram dissecados. Fragmentos do jejuno foram coletados, lavados em 1XPBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4), fixados em paraformaldeído 2% por 48 horas e armazenados em álcool 70%, à temperatura ambiente, até o momento do processamento histológico.

4.2.2 Processamento histológico

Fragmentos do jejuno foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70% a 100%), por 60 minutos cada, à temperatura ambiente, e diafanizados em xilol, por 2 vezes, por 30 minutos cada, à temperatura ambiente. Os fragmentos foram emblocados em parafina. Cortes seriados longitudinais de 5 µm foram obtidos, corados com hematoxilina de Harris e eosina (H.E.) e montados com lamínula usando a resina Permount. As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus DP72 e as imagens obtidas foram analisadas.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA INJEÇÃO DE 5 – BROMO - 2'- DEOXIURIDINA (BRDU) *in ovo* PARA AVALIAR A PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE O PROCESSO DE BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

O BrdU é uma pirimidina análoga da timina que é incorporado ao DNA durante a fase S do ciclo celular e revelado por anticorpos (anti-BrdU) pela técnica de imunohistoquímica (MUSKHELISHVILLI et al, 2003). Diante das vantagens de sua utilização o BrdU foi escolhido como marcador de proliferação celular nesse trabalho.

4.3.1 Via de injeção de BrdU

Ovos de 13 dias de incubação foram higienizados com hipoclorito de sódio comercial e observados em ovoscópio (lâmpada fria de LED) no fluxo laminar (Veco VLFS 12), em condições estéreis. Todo material utilizado foi esterilizado em autoclave ou estufa à seco. Um orifício foi feito na casca dos ovos com o auxílio de uma agulha hipodérmica (Labor Import 25 X 0,80 mm/ 21 G x 1”) e 100 µl do corante vital azul de metileno 1%/1XPBS (esterilizado com filtro de 0,22 µm de diâmetro - Millipore) foi injetado utilizando uma agulha de insulina (Injex 13 x 0,45 mm) em diferentes locais: Via 1: alantoide; Via 2: âmnio; Via 3: câmara de ar; Via 4: vitelo; Via 5: corpo do embrião. Para cada via foram utilizados 3 animais. Após injeção, os ovos foram selados com parafilm e novamente incubados até o momento do sacrifício. Os animais foram pesados antes do sacrifício para se obter a média do peso corporal a fim de calcular a concentração de BrdU a ser injetada. Os animais foram sacrificados 5h após a injeção do azul de metileno e análises macroscópicas do corpo do embrião, anexos embrionários e intestino delgado foram realizadas para detectar a incorporação do corante.

4.3.2 Determinação da concentração mínima de BrdU para a marcação das células em processo de proliferação

Embriões de 13 dias de incubação foram injetados com diferentes concentrações de BrdU: Concentração 1: 6 mg/Kg do embrião; Concentração 2: 12 mg/Kg do embrião; Concentração 3: 24 mg/Kg do embrião; Concentração 4: 48 mg/Kg do embrião. Para cada concentração foram utilizados 3 animais. Após higienização dos ovos e observação em ovoscópio (ver item 4.3.1), um orifício foi feito na casca do ovo com o auxílio de agulha hipodérmica (Labor Import 25 X 0,80 mm/ 21 G x 1”) e 100 µl de BrdU (Sigma- Aldrich)/1XPBS estéril foram injetados no corpo do embrião com o auxílio de uma agulha gengival estéril (Septoject XL 27G 0,40 X 30 mm) acoplada à seringa de anestesia odontológica do tipo carpule (Golgram 12,5 cm). Após injeção, os ovos foram selados com parafilm e novamente incubados até o momento do sacrifício. Os animais foram sacrificados 5h após a injeção de BrdU. Fragmentos de jejuno foram coletados, processados para histologia convencional (ver item 4.2.2), substituindo as

lâminas comuns por silanizadas (Starfrost, Knittel), e os cortes foram submetidos à imunohistoquímica (ver item 4.4.2). As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus DP72 e as imagens obtidas foram analisadas.

4.3.3 Sobrevivência e desenvolvimento dos embriões após injeção de BrdU

Embriões de 13 dias de incubação foram injetados (ver item 4.3.2) com 100 µl de BrdU/1XPBS estéril (48 mg/Kg do embrião). Os animais foram sacrificados 1h, 3h, 17h e 24 h após a injeção. Para cada tempo de sacrifício foram utilizados 3 animais. Fragmentos de jejuno foram coletados, processados para histologia convencional (ver item 4.2.2), substituindo as lâminas comuns por silanizadas, e os cortes foram submetidos à imunohistoquímica (ver item 4.4.2). As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus DP72 e as imagens obtidas foram analisadas.

4.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR (MARCAÇÃO POR BRDU) DURANTE O PROCESSO DE BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

4.4.1 Injeção de BrdU *in ovo*

Embriões de 13 dias de incubação foram injetados (ver item 4.3.2) com 100 µl de BrdU/1XPBS estéril (48 mg/Kg do embrião). Os embriões foram sacrificados 2h, 8h, 16h, 24h, 32h, 40h, 48h, 56h e 64h após a injeção. Para cada tempo de sacrifício foram utilizados 3 animais. Fragmentos de jejuno foram coletados, processados para histologia convencional (ver item 4.2.2), substituindo as lâminas comuns por silanizadas.

4.4.2 Imunohistoquímica

Previamente foram padronizadas a concentração do anticorpo monoclonal (anti-BrdU) e a solução de bloqueio para ligações inespecíficas. As concentrações do anticorpo avaliadas foram: a) 1: 250; b) 1: 500 e c) 1: 1000. As soluções de bloqueio avaliadas foram: a) 1XPBS/BSA 3%; b) “Antibody Diluent, Background Reducing” (DAKO); c) solução de bloqueio (Leica) e d) 1XPBS/ leite molico 5%.

Os cortes de jejuno foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% a 70%) e imersos em HCl 1N, por 1 hora, a 40°C, para depuração do DNA. Os cortes foram lavados em água destilada e tratados, por 3 vezes, com peróxido de hidrogênio 3%, por 10 minutos cada, para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água corrente, por 3 vezes, por 10 minutos cada, e, em seguida, em 1XPBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito em 1XPBS/BSA 3%, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal (anti-BrdU- Millipore-Chemicon), na concentração de 1:500, preparados em solução 1XPBS/BSA 1%, por 16 horas, a 4°C. Os cortes foram lavados em 1XPBS e incubados com o anticorpo secundário usando o kit universal DAKO LSAB, por 30 minutos, a 37°C. Os cortes foram lavados novamente em 1XPBS e a marcação foi revelada por meio de incubação com um substrato da peroxidase, o 3,3 diaminobenzidina (DAB) 3% (Sigma-Aldrick), preparado em 1XPBS/H₂O₂ 1,25%/DMSO 1,25%, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina de Harris, por 1 minuto. Após coloração, os cortes foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70% a 100%), por 2 minutos cada, e montados com lamínulas usando Permount. Em um dos cortes para cada tempo analisado, e para cada animal, o anticorpo primário foi substituído por 1XPBS/BSA 1% (controle negativo). Cortes de jejuno de rato adulto injetado com BrdU (50 mg/kg do animal) foram submetidos à imunohistoquímica juntamente com os de embriões de galinhas (controle positivo). Os cortes foram fotografados em microscópio Olympus DP72 e as imagens obtidas foram analisadas.

4.5 ORIGEM DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA: MARCAÇÃO DA MEMBRANA BASAL PELA REAÇÃO DE PAS (ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF)

A reação de PAS baseia-se na oxidação de radicais 1,2-glicol de polissacarídeos pelo ácido periódico, gerando resíduos de aldeído, os quais podem ser revelados pelo reagente de Schiff.

Cortes de jejuno de embriões de 15 dias foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% a 70%) e lavados em água corrente, por 10 minutos. Os cortes foram rapidamente lavados em água destilada, por duas vezes, e imersos em ácido periódico 0,5%, por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada, por 3 vezes, e submetidos ao reativo de Schiff, por 20 minutos. Os cortes passaram por 3 banhos de água sulfurosa, por 2 minutos cada, e foram lavados em água corrente, por 10 minutos. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, por 1 minuto, desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70% a 100%), por cinco minutos cada, e montados com lamínula usando a resina Permount. Os cortes foram fotografados em microscópio Olympus DP72 e as imagens obtidas foram analisadas.

5 RESULTADOS

5.1 PERÍODO DE OCORRÊNCIA DA BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

Análises histológicas do jejuno de embriões de galinhas entre o 12º e 17º dia de incubação foram realizadas para delimitar o período em que ocorre a bifurcação das projeções da mucosa (precursoras das vilosidades). Essas análises permitiram estabelecer que o processo de bifurcação das projeções da mucosa ocorre ao longo da extensão do jejuno entre o 13º e 15º dia de incubação e identificar os seus principais eventos (Figura 7): 12º dia de incubação: não foi observada bifurcação das projeções da mucosa (Figura 7a); 13º dia de incubação: o processo de bifurcação foi observado nas projeções da mucosa, que estavam mais altas, pela presença de cordões de células na lâmina própria e formação de lúmen secundário no seu interior (Figura 7b); 14º dia de incubação: lúmen secundário amplo foi observado (Figura 7c); 15º dia de incubação: surgiram estruturas com morfologia semelhante a das vilosidades, que foram denominadas no presente trabalho de pré-vilosidades. Neste tempo também foram observadas novas projeções da mucosa, entre as pré-vilosidades, que foram denominadas no presente trabalho de projeções tardias (Figura 7d); 16º dia de incubação: as pré-vilosidades estavam individualizadas e observou-se o crescimento das projeções tardias (Figura 7e). 17º dia de incubação: a morfologia das pré-vilosidades e projeções tardias estava melhor definida (Figura 7f).

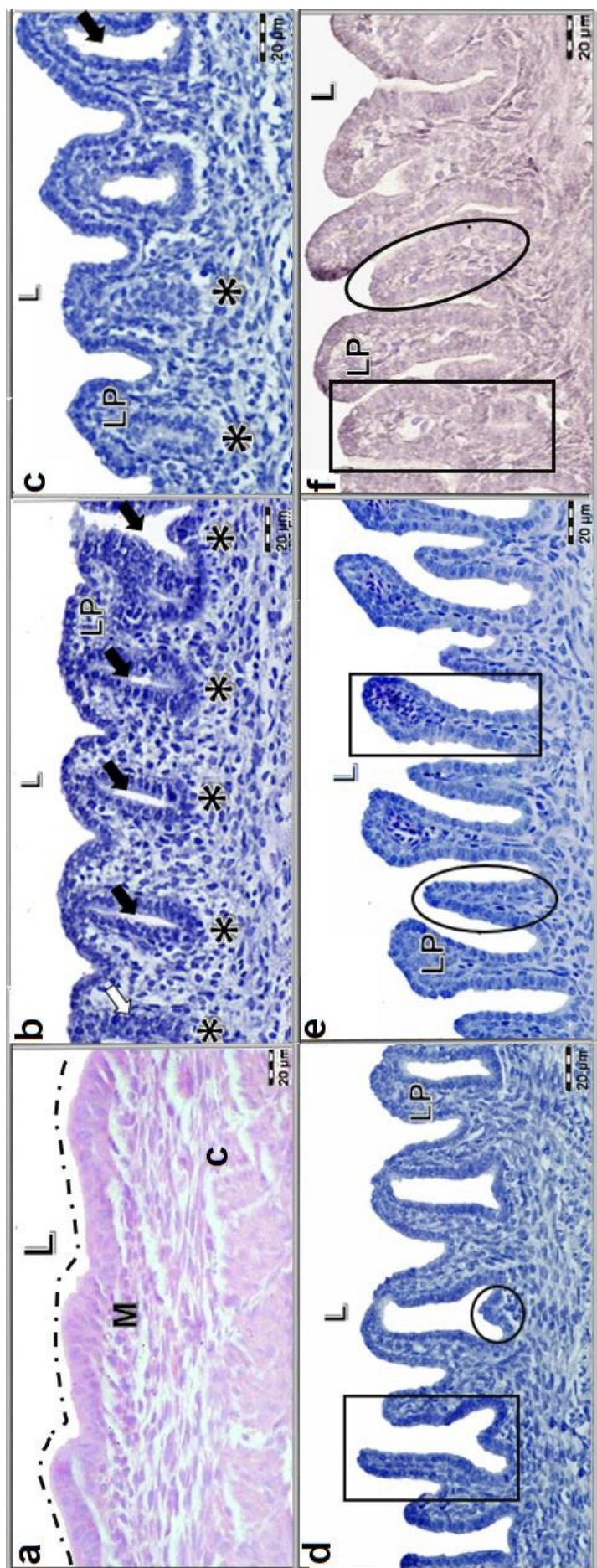


Figura 7 - Cortes longitudinais do jejuno de embriões de galinhas submetidos à coloração HE. **a)** 12º dia de incubação: não foi observada bifurcação da projeção da mucosa (tracejado). **b)** 13º dia de incubação: projeção da mucosa em processo de bifurcação (asteriscos). Cordão de células (seta branca) e lúmen secundários (setas pretas) foram observados. **c)** 14º dia de incubação: projeção da mucosa em processo de bifurcação (asteriscos). Lúmen secundário amplo foi observado (seta preta). **d)** 15º dia de incubação: pré-vilosidades (retângulo). Projeção tardia entre as pré-vilosidades (círculo). **e)** 16º dia de incubação: pré-vilosidades individualizadas (retângulo) e projeções tardias maiores (elipse). **f)** 17º dia de incubação: A morfologia das pré-vilosidades (retângulo) e projeções tardias melhor definida (círculo). **L** - Lúmen principal; **LP** - Lâmina própria; **M** - Mesênquima

5.2 PADRONIZAÇÃO DA INJEÇÃO DE BRDU *in ovo*

Com o intuito de estabelecer a via para injeção de BrdU, o corante vital azul de metileno foi injetado no alantoide, âmnio, câmara de ar, vitelo e corpo do embrião de 13 dias de incubação. O corpo do embrião foi a única via que apresentou incorporação do corante. Nessa etapa, o peso médio dos embriões foi calculado como sendo 10,48 g. Esse valor foi utilizado para calcular a concentração de BrdU a ser injetada nos embriões.

Embriões de 13 dias de incubação foram injetados com diferentes concentrações de BrdU (6, 12, 24, ou 48 mg/Kg do embrião) a fim de determinar a dose mínima para marcação das células em processo de proliferação no jejuno. As concentrações de 6, 12 e 24 mg/Kg do embrião resultaram em marcação ausente ou fraca e não uniforme nos embriões (Figura 8A). A concentração de 48 mg/Kg do embrião foi a única que resultou em marcação forte e uniforme (Figura 8B). Nessa etapa da padronização, a substituição da agulha de insulina por agulha gengival acoplada à seringa de anestesia odontológica do tipo carpule foi mais eficiente em alcançar o corpo do embrião.

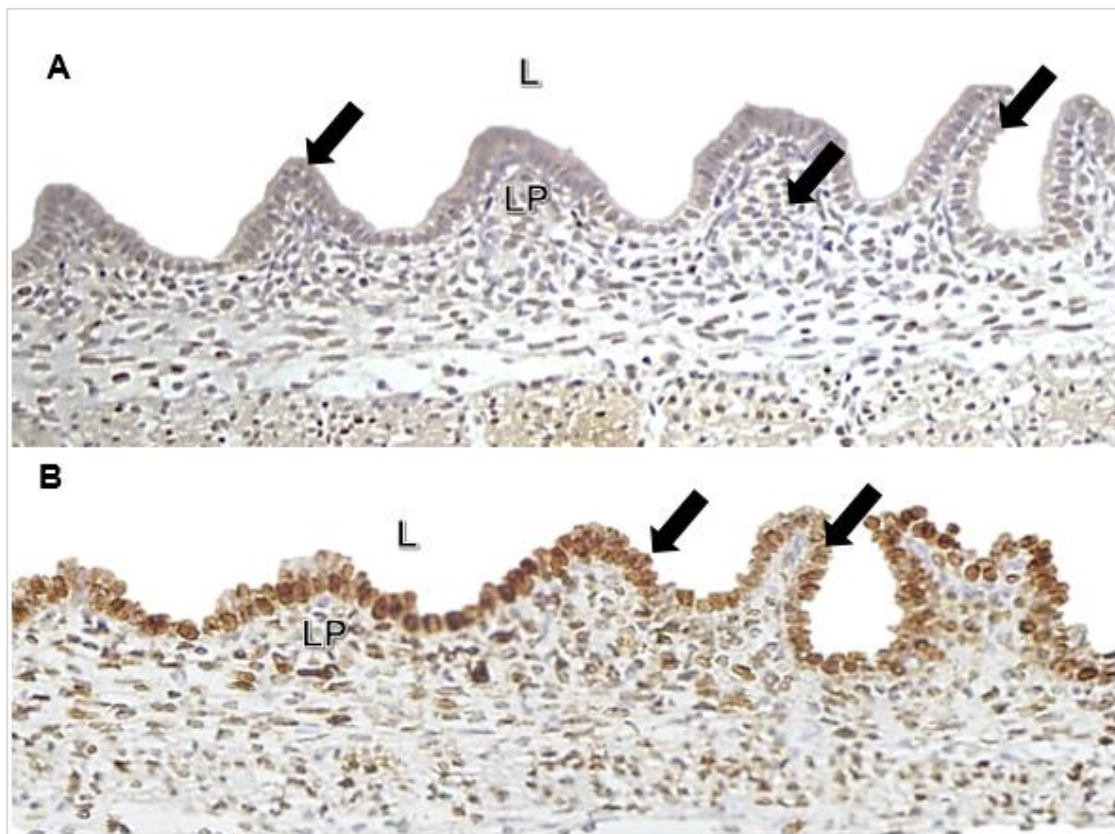


Figura 8 - Cortes longitudinais do jejuno de embriões de galinhas injetados com diferentes concentrações de BrdU no 13º dia de incubação e submetidos à imunohistoquímica (coloração marrom). **A**- Ausência de marcação por BrdU nas células do epitélio e no interior da lâmina própria (grupo de células) com injeção de 6 mg/kg do embrião (setas). **B**- Células do epitélio da mucosa marcadas por BrdU com a injeção de 48 mg/kg do embrião (setas). L – lúmen principal; LP – Lâmina própria.

Outro parâmetro avaliado na etapa de padronização foi a sobrevivência e o desenvolvimento dos embriões de 13 dias de incubação após a injeção de BrdU em diferentes tempos. A sobrevivência foi de 85%. As análises histológicas do jejuno após o procedimento de injeção mostraram que a morfologia da mucosa era a mesma dos animais usados na etapa de delimitação da ocorrência da bifurcação das projeções da mucosa (não injetados) (Figura 9).

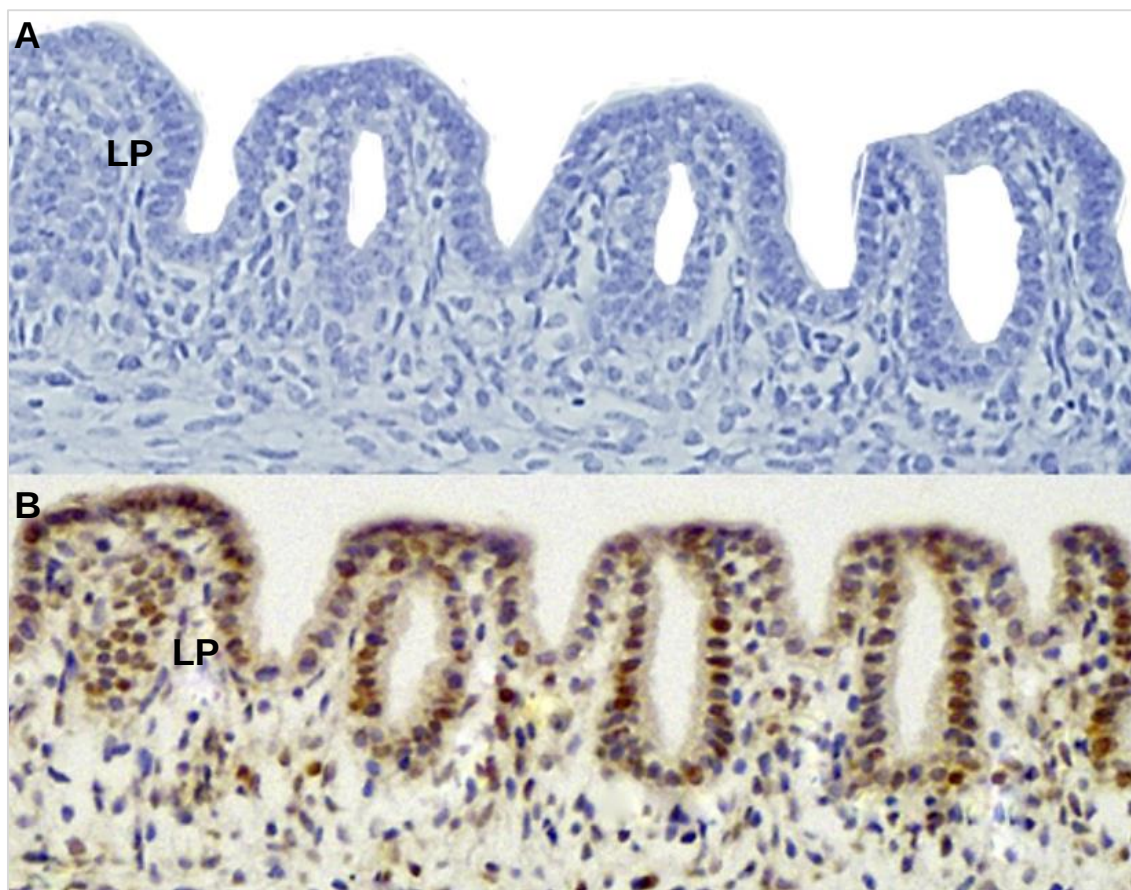


Figura 9 – Cortes longitudinais do jejuno de embriões de galinhas com 14 dias de incubação não-injetados com BrdU (A) e injetados com BrdU (B). LP: lâmina própria

5.3 BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A descrição morfológica e a avaliação da proliferação celular (marcação por BrdU) durante o processo de bifurcação das projeções da mucosa são apresentadas na Figura 10. As figuras são apresentadas na ordem em que ocorrem as mudanças morfológicas correlacionadas à proliferação celular durante o processo da bifurcação das projeções da mucosa.

O epitélio das projeções da mucosa ao longo do jejuno estava em processo de proliferação celular (Figura 10a).

Grupos de células em processo de proliferação invadiram a lâmina própria (Figura 10b).

Os grupos de células em proliferação estavam maiores e se aprofundaram na lâmina própria. Entretanto, o contato com o epitélio da mucosa foi mantido (Figura 10c).

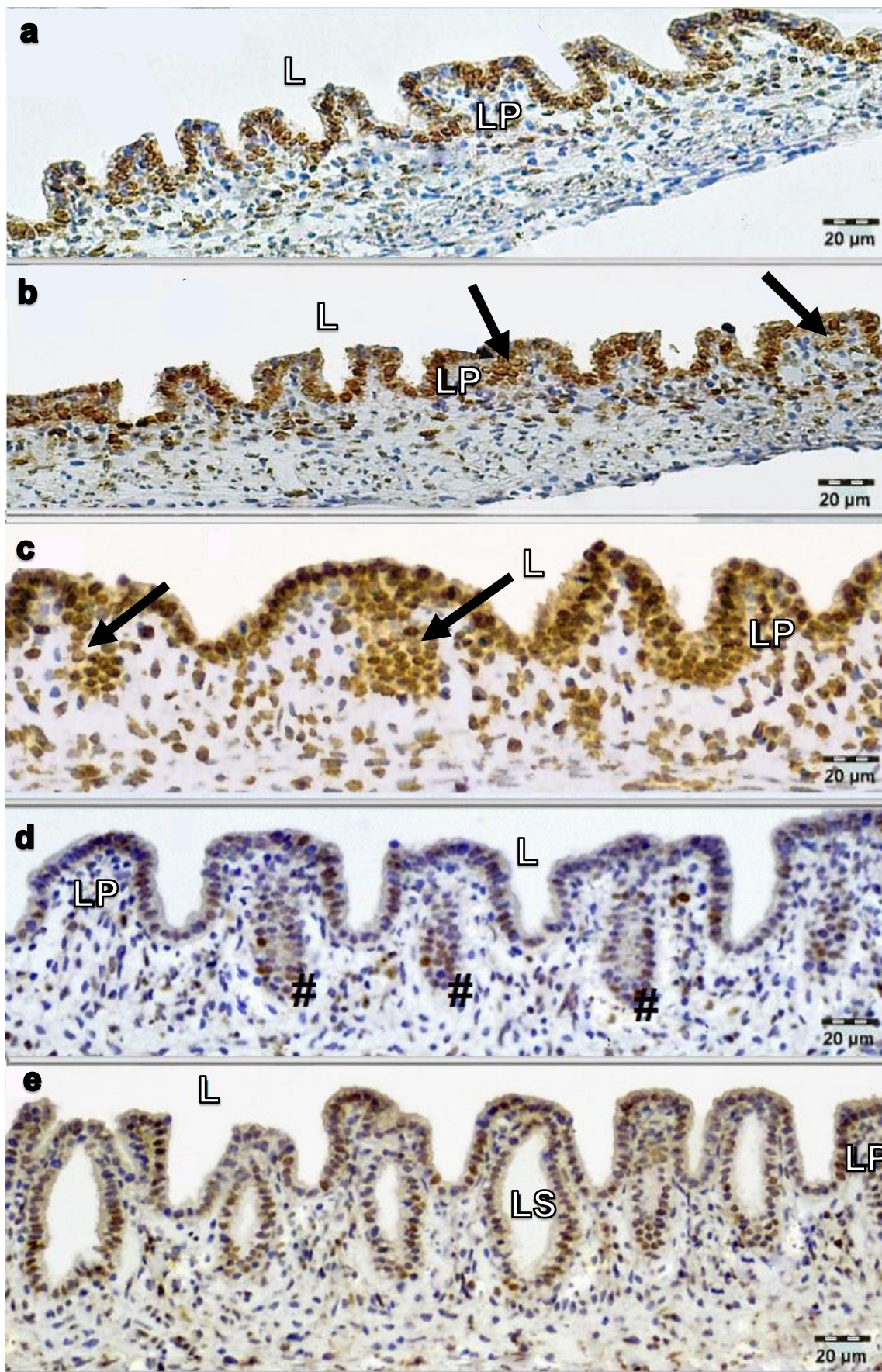
Os grupos de células passaram a apresentar uma forma alongada no sentido vertical, em relação à camada epitelial da mucosa, formando um cordão de células (Figura 10d).

As células do cordão perderam o contato entre elas (rompimento de adesão celular), dando origem a um espaço denominado de lúmen secundário. Essas mantiveram a proliferação e se organizaram em uma camada única que delimitava o lúmen secundário até próximo da camada epitelial da mucosa (Figura 10e).

A camada celular que revestia o lúmen secundário fundiu-se com o epitélio da mucosa e o lúmen secundário passou a ter comunicação com o lúmen principal, dando origem a estruturas com morfologia semelhante a das vilosidades – pré-vilosidades. A camada celular que revestia o lúmen secundário passou a formar o epitélio das pré-vilosidades (Figura 10f).

Entre as pré-vilosidades apareceram novas projeções da mucosa – projeções tardias (Figura 10g).

Células em processo de degeneração, após a fusão do lúmen secundário com o lúmen principal, foram observadas se desprendendo da região apical das pré-vilosidades (Figura 10h).



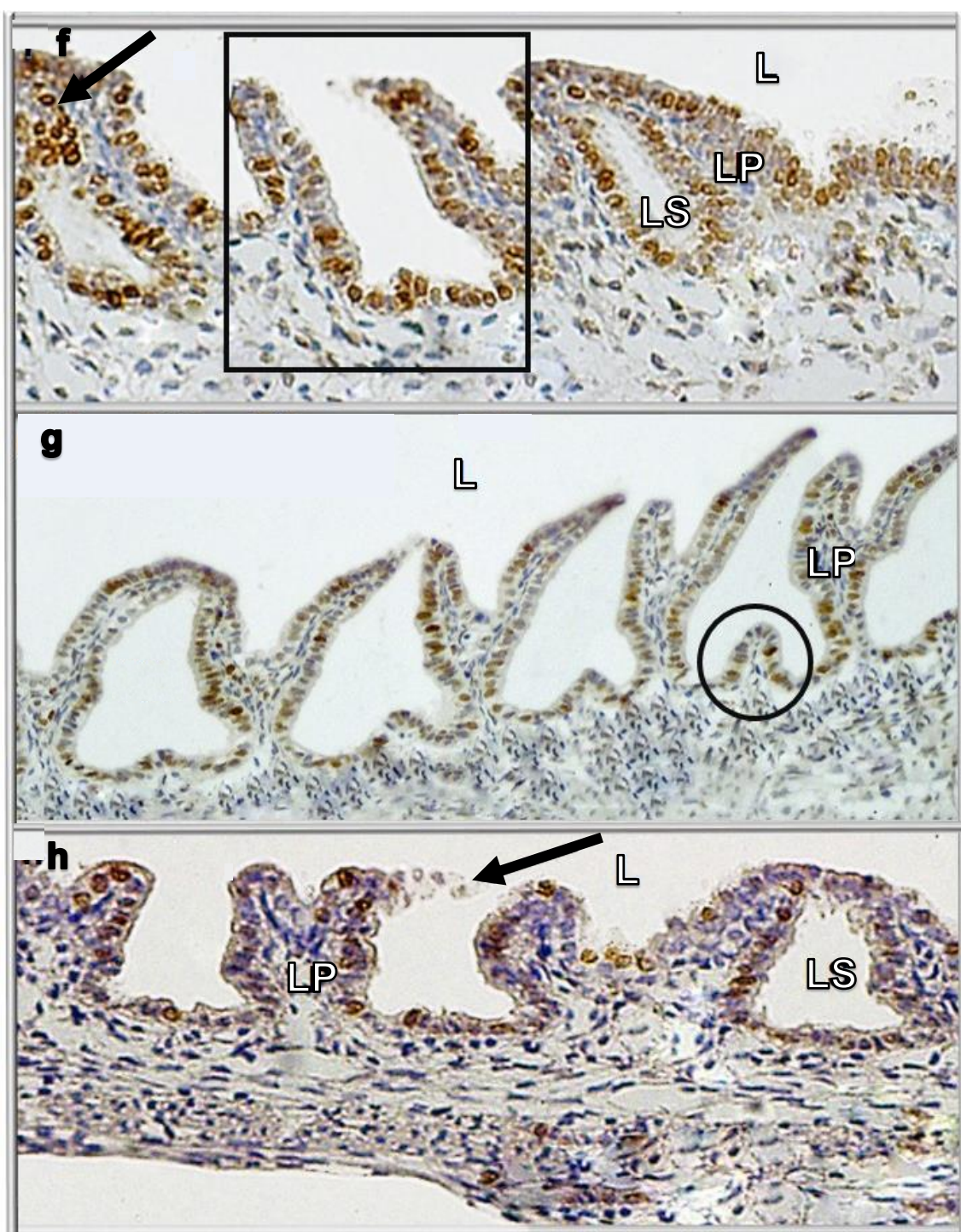


Figura 10 - Cortes longitudinais do jejuno de embriões de galinhas injetados com BrdU (48 mg/Kg do embrião) no 13º dia de incubação e sacrificados em diferentes tempos, submetidos à imunohistoquímica (coloração marrom). **a e b** – 16h após a injeção; **f e h** – 32h após a injeção; **c** – 40h após a injeção; **d e e** – 48h após a injeção; **g**- 64h após a injeção. **a)** células do epitélio da mucosa estavam proliferando. **b)** grupos de células proliferando no interior da lâmina própria (setas). **c)** aumento do tamanho e aprofundamento dos grupos de células em proliferação na lâmina própria (setas). **d)** cordão de células no interior da lâmina própria (#). **e)** lúmen secundário (LS) é visualizado no cordão de células. **f)** pré-vilosidades (retângulo). **g)** projeções tardias (círculo). **h)** células em processo de degeneração se desprendendo da região apical das pré-vilosidades (seta). **L** - Lúmen principal; **LP** –Lâmina própria

5.4 A ORIGEM EPITELIAL DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

As células que formam o cordão no interior da lâmina própria apresentam membrana basal revelada pela reação de PAS (Figura 11).

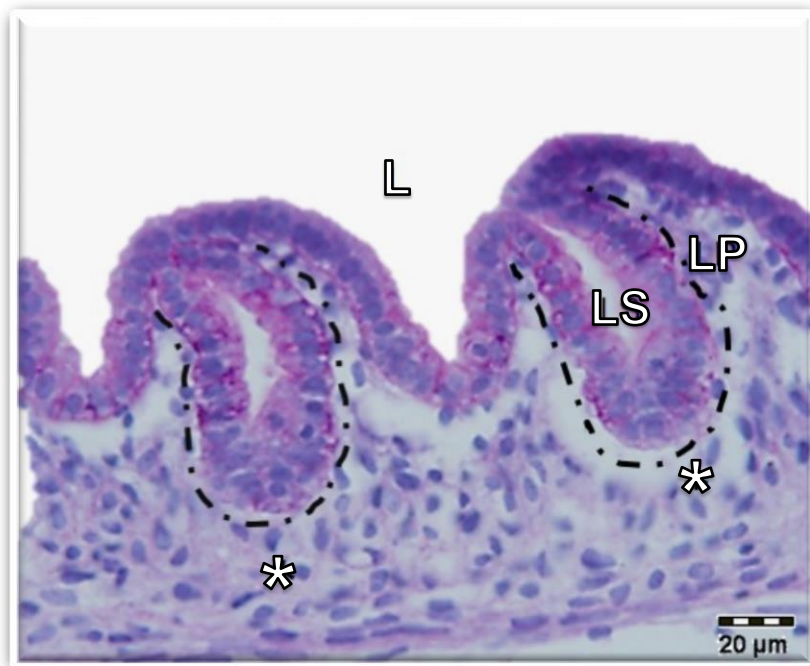


Figura 11 – Corte longitudinal do jejuno de embrião de galinhas de 15 dias de incubação submetido à reação de PAS (cor púrpura). Membrana basal (tracejado) das células que formam cordões no interior da lâmina própria (asteriscos). **L** - Lúmen principal; **LP** - Lâmina própria; **LS** - Lúmen secundário.

6 DISCUSSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DA INJEÇÃO DE BRDU *in ovo*

Para avaliar a proliferação celular no jejuno de embriões de galinhas durante o processo de bifurcação das projeções da mucosa, a injeção de BrdU *in ovo* foi padronizada no Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A padronização foi necessária porque a literatura apresentava distintas vias, concentração de BrdU e equipamentos (agulhas e seringas) para o procedimento de injeção (BLOOM; HSU, 1975; MYAT et al., 1996; HENRIQUE et al., 1997; FARACO et al., 2001; STRIEDTER; KEEFER et al., 2000; JOCHEMSEN; JEURISSEN, 2002; LINCOLN et al., 2004; ISHIMARU et al., 2008; KOSZINOWSKI et al., 2015).

Os resultados da padronização permitiram estabelecer como via de injeção o corpo do embrião, a concentração mínima de 48 mg de BrdU/Kg do embrião e o uso de seringa de anestesia odontológica do tipo carpule com agulha gengival. A padronização da injeção de BrdU foi importante porque possibilita a realização de estudos em nosso laboratório que envolvam análises de proliferação e/ou migração celular em embriões de galinhas a partir do 13º dia de incubação, e também em estágios anteriores nos quais o corpo do animal possa ser alcançado com o sistema de injeção sem que haja destruição dos anexos embrionários e/ou tecidos e órgãos.

Outro parâmetro avaliado na etapa de padronização foi a sobrevivência e o desenvolvimento dos embriões após a injeção de BrdU. Os resultados permitiram concluir que o procedimento de injeção não compromete a viabilidade da maioria dos embriões e o desenvolvimento.

6.2 FORMAÇÃO DAS PRÉ-VILOSIDADES NO JEJUNO DE EMBRIÕES DE GALINHAS A PARTIR DA BIFURCAÇÃO DAS PROJEÇÕES DA MUCOSA

As análises histológicas permitiram estabelecer que o processo de bifurcação das projeções da mucosa no jejuno de embriões de galinhas ocorre entre o 13º e 15º dia de incubação. Esses resultados diferem dos de Camargo et al. (2016), que observaram bifurcação das projeções da mucosa no 16º dia de incubação. Essas diferenças cronológicas na morfogênese das vilosidades intestinais em galinhas podem ser explicadas por variações na temperatura do embrião, mesmo quando incubados em condições controladas. As variações são causadas pela produção de calor por meio do metabolismo do animal, que varia entre espécimes, bem como sua dissipação, que depende da condutância térmica da casca do ovo e do ar circundante (FRENCH, 1997). A variação na temperatura do embrião pode levar a diferenças no desenvolvimento de até dois dias para mais ou menos (ROMANOFF; SMITH; SULLIVAN, 1938 apud DEEMING; FERGUSON, 1991), e pode ser um dos fatores responsável pelas diferenças cronológicas observadas em relação à ocorrência da bifurcação das projeções da mucosa entre os trabalhos.

As análises histológicas permitiram também definir a sequência de mudanças morfológicas que leva à bifurcação das projeções da mucosa: a) surgimento, crescimento e aprofundamento de um grupo de células no interior da lâmina própria; b) Reorganização do grupo de células na forma de cordão; c) Perda de adesão celular entre células do cordão, originando um lúmen secundário; d) Fusão da camada celular que revestia o lúmen secundário com epitélio da mucosa e comunicação do lúmen secundário com o lúmen principal, originando as pré-vilosidades. O epitélio das pré-vilosidades é formado pela camada celular que revestia o lúmen secundário. Após a fusão do lúmen secundário com o lúmen principal, células em processo de degeneração são observadas na superfície apical das pré-vilosidades. É possível sugerir que essas células sejam do epitélio da mucosa e estejam sofrendo morte celular programada, que pode ser um evento da finalização do processo de bifurcação.

A avaliação da proliferação celular por incorporação de BrdU nos embriões mostrou que o epitélio da mucosa e das células envolvidas no processo de bifurcação estavam proliferando. Esses dados permitem sugerir que as células envolvidas no processo de bifurcação se originaram do epitélio da mucosa e mantiveram o estado proliferativo, levando à formação das pré-vilosidades.

A reação de PAS revelou a presença de membrana basal nas células envolvidas no processo de bifurcação. Esses resultados reforçam a ideia de que essas células se originaram do epitélio da mucosa.

Os eventos iniciais do processo de bifurcação das projeções da mucosa jejunal em embriões de galinhas descritos no presente trabalho apresentam similaridades com a morfogênese das glândulas exócrinas. Na morfogênese das glândulas exócrinas, células epiteliais proliferam e dão origem a um broto epitelial que penetra no tecido conjuntivo subjacente e origina uma coluna de células. A membrana basal expande e circunda a coluna de células, que se reorganiza de maneira que sua porção ligada ao epitélio forma o ducto excretor e a sua porção final a estrutura secretora da glândula exócrina (WANG; LAURIE, 2004; TUCKER, 2007).

Embora diversos trabalhos sobre a morfogênese das vilosidades intestinais em embriões de galinhas tenham sido realizados, o enfoque é nos mecanismos envolvidos na formação das projeções da mucosa, no seu dobramento e estabelecimento do padrão zigue-zague, não enfatizando o que ocorre no interior das projeções. Nos trabalhos é descrito que até o 8º dia do desenvolvimento embrionário de galinhas a mucosa intestinal é lisa. No 8º dia surgem projeções da mucosa ao longo do intestino delgado (precursoras das vilosidades). A partir do 13º dia essas projeções sofrem dobramento e estabelecem um padrão zigue-zague, que é a base para a formação das vilosidades (COULOMBRE e COULOMBRE, 1958; HAYES, 1965; GREY, 1972; SABATAKOU et al., 2003; WALTON et al., 2016 a, b).

Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que estruturas individualizadas com morfologia semelhantes a das vilosidades, denominadas no presente trabalho de pré-vilosidades, são formadas a partir da bifurcação das projeções da mucosa entre o 13º e o 15º dia de incubação. As pré-vilosidades darão origem às vilosidades propriamente ditas, as quais passarão por alterações morfofuncionais nos estágios finais do desenvolvimento embrionário e logo após a eclosão (UNI et al., 2000; GEYRA; UNI; SKLAN, 2001; NOY; SKLAN, 2001; UNI et al., 2003).

Em humanos, porcos, ratos e camundongos, o surgimento das vilosidades intestinais não envolve a formação de projeções da mucosa, como ocorre em

galinhas. Nesses animais, as vilosidades emergem diretamente da mucosa lisa (WALTON, 2016 a, b). Os distintos modos de formação das vilosidades entre esses animais podem estar relacionados a diferenças no crescimento e maturação dessas estruturas. Evidências disso vêm de estudos comparativos da morfometria das vilosidades intestinais entre galinhas e ratos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal (ARAÚJO et al., 2014). Os autores propuseram que a morfogênese das vilosidades em galinhas ocorre em estágio do desenvolvimento embrionário anterior ao de ratos, uma vez que vilosidades com morfologia digitiforme, medindo até 150 μm , estavam presentes em embriões de galinhas de 17 dias de incubação e ausentes em ratos no mesmo estágio do desenvolvimento. Esses estudos revelaram ainda que no dia da eclosão, os pintinhos apresentavam aproximadamente 87% das vilosidades maiores que 250 μm , enquanto filhotes de ratos no dia do nascimento apresentavam apenas 7% das vilosidades intestinais maiores que 250 μm . Dentro desse contexto, sugere-se que a bifurcação das projeções da mucosa possa ser um mecanismo que acelera a formação das vilosidades em galinhas e, conseqüentemente, o seu processo de crescimento e maturação. Essas diferenças entre galinhas e ratos podem ser reflexo da mudança na dieta após o nascimento. Nos primeiros dias após a eclosão, o intestino delgado de galinhas é afetado funcionalmente pela mudança no tipo de alimento ingerido, que deixa de ser líquido e rico em lipídios (vitelo) e passa a ser sólido e composto basicamente por carboidratos e proteínas (LILJA, 1983; NOY; SKLAN, 2001). Por outro lado, em ratos, a mudança de uma dieta líquida rica em gordura (leite) para uma dieta sólida rica em carboidratos é gradual e ocorre do 14º dia de vida pós-natal até próximo do dia do desmame, no 21º dia de vida pós-natal (BUDDINGTON, 1994; HENNING, 1981).

As análises morfológicas também evidenciaram a formação de novas projeções da mucosa entre as pré-vilosidades, que foram denominadas no presente trabalho de projeções tardias. Segundo Grey (1975), esse tipo de projeção representa um segundo modo de formação das vilosidades intestinais em embriões de galinhas.

Embora tenha sido sugerido nesse estudo que as células envolvidas no processo de bifurcação têm origem no epitélio de revestimento da mucosa, outros estudos são necessários para comprovar a sua origem. Uma possível

molécula alvo a ser investigada é a laminina, um componente da lâmina basal das células epiteliais. Outra perspectiva do trabalho é investigar os aspectos moleculares envolvidos no processo de bifurcação. Tem sido proposto que a via de sinalização hedgehog está relacionada com a formação das vilosidades em diversos modelos de estudo (FUKUDA E YASUGI, 2002; MADISON et al., 2005; MCLIN; HENNING; JAMRICH, 2009; KOLTERUD et al., 2009) e a investigação dessa via durante a bifurcação poderia contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Proteínas relacionadas à remodelação da membrana basal, como TIMP1 e MMP3, também podem ser possíveis alvos de estudo, uma vez que essas são importantes para os eventos iniciais da morfogênese das glândulas exócrinas (WANG; LAURIN, 2004).

7 CONCLUSÃO

- A padronização da injeção de BrdU *in ovo* para embriões no 13º dia de incubação foi estabelecida no Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- A bifurcação das projeções da mucosa do jejuno de galinhas ocorre entre o 13º e 15º dia de incubação.
- A bifurcação envolve mudanças morfológicas no epitélio e lâmina própria que culminam com a formação das pré-vilosidades.
- As mudanças morfológicas da bifurcação estão correlacionadas à proliferação do epitélio da mucosa e das células que originam as pré-vilosidades.
- A origem epitelial das células que formam as pré-vilosidades foi revelada pela presença da membrana basal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAR, M.B.; JIA, F. Anisotropic growth shapes intestinal tissues during embryogenesis. **PNAS** 110: 10525–10530, 2013.

ARAÚJO, G.A.T. Análise comparativa de parâmetros morfométricos do intestino delgado entre ratos (*Rattus norvegicus*) e galinhas (*Gallus gallus domesticus*) ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais do XXII Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC e do III Encontro Anual de Iniciação e Inovação Tecnológica – EAITI**. Foz do Iguaçu- PR, 2014.

BALBI, V.; CIARLETTA, P. Morpho-elasticity of intestinal villi. **Journal The Royal Society Interface** 10: 1-9, 2013.

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

BLOOM, S.E., HSU, T.C.; Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. **Chromosoma** 51: 261-267, 1975.

BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2002. p.75-98.

BUDDINGTON, R.K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 72: 251-259, 1994.

BURGESS, D.R. Morphogenesis of intestinal villi: Mechanism of formation of previllous ridges. **Journal of Embryology and Experimental Morphology** 34: 723-740, 1975.

CAMARGO, K.C. et al. MT1-MMP and its potential role in the vertebrate intestinal morphogenesis. **Acta Histochemica** 118: 729-735, 2016.

COLLINS, J.F. et al. Molecular aspects and regulation of gastrointestinal function during postnatal development. **Physiology of the Gastrointestinal 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. **Journal of Embryology and Experimental Morphology** 6: 403-411, 1958.

DAUÇA, M. et al. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. **Journal of Developmental Biology** 34: 205-218, 1990.

DEEMING, D. C.; FERGUSON, M.W.J. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. In: **Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles**. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 147–172.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. The digestive system: challenges and opportunities. **The Journal of Applied Poultry Research** 13: 86–93, 2004.

DUKE, G.E. Alimentary canal: anatomy, regulation of feeding, and motility. In: STURKIE, P.D. **Avian Physiology**. 4. ed. New York: Springer, 1986. cap. 12. p. 269–288.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2010. 834p.

FARACO, C.D. et al. Hyperpigmentation in the silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. **Developmental Dynamics** 220: 212–225, 2001.

FRENCH N.A. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. **Poultry Science** 76: 124–133, 1997.

FUKUDA, K.; YASUGI, S. Versatile roles for sonic hedgehog in gut development. **Journal of Gastroenterology** 37: 239–246, 2002.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science** 80: 776–782, 2001.

GREY, R.D. Morphogenesis of intestinal villi I: scanning electron microscopy of the duodenal epithelium of the developing chick embryo. **Journal of Morphology** 137: 193–214, 1972.

GROSSE, A.S. et al. Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: implications for intestinal growth and morphogenesis. **Development** 138: 4423–4432, 2011.

HAYES, R. L.; The maturation of cortisone-treated embryonic duodenum *in vitro*. I. The villus. **Journal of Embryology and Experimental Morphology** 14: 161–168, 1965.

HENNING, S.J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **American Journal of Physiology** 241: 199–214, 1981.

HENRIQUE, D. et al. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by delta–notch signalling in the embryonic chick retina. **Current Biology** 7: 661–670, 1997.

HIRAMATSU, H.; YASUGI, S. Molecular analysis of the determination of developmental fate in the small intestinal epithelium in the chicken embryo. **The International Journal of Developmental Biology** 48: 1141–1148, 2004.

ISHIMARU, Y. et al. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. **Development** 135: 677-685, 2008.

JOICHEMSEN, P.; JEURISSEN, S. H. M. The localization and uptake of *in ovo* injected soluble and particulate substances in the chicken. **Poultry Science** 81: 1811–1817, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KOLTERUD, A. et al. Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. **Gastroenterology** 137: 618-628, 2009.

KOSZINOWSKI, S. et al. RAR β regulates neuronal cell death and differentiation in the avian ciliary ganglion. **Developmental Neurobiology** 75: 1204-1218, 2015

LILJA, C. A. Comparative study of postnatal growth and organ development in some species of birds. **Growth** 47: 317-319, 1983.

LINCOLN, J. et al. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. **Developmental Dynamics** 230: 239–250, 2004.

MADISON, B. B. et al. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. **Development** 132:279–289, 2005.

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

MUSKHELISHVILLI, L. et al. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki- 67 (MIB- 5): Immunohistochemistry and In Situ hybridization for histone mRNA. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** (12) 51: 1688 – 1681, 2003

MYAT, A. et al. A chick homologue of serrate and its relationship with notch and delta homologues during central neurogenesis. **Developmental Biology** 174: 233–247, 1996.

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

OZAYDIN, T.; CELIK, I. Histological, histochemical and immunohistochemical investigations on the developing small intestine of broiler embryos. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 11: 2936- 2944, 2012.

RAO, J.N.; WANG, J.Y.; **Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth**. 2. ed. San Rafael: Morgan & Claypool Life Science, 2016. 146 p.

SABATAKOU, O. et al. The development of the chicken small intestine: a scanning electron microscopy study. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 35: 232-330, 2003.

SHYER, A.M. et al. Villification: how the gut gets its villi. **Science** 342: 212–218, 2014.

SMITH, D. M. et al. Evolutionary relationships between the amphibian, avian, and mammalian stomachs. **Evolution and Development** 2: 348-359, 2000.

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

SPENCE et al. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. **Seminars in Cell and Development Biology** 66: 81- 93, 2016.

STRIEDTER, G. F.; KEEFER, B. P. Cell migration and aggregation in the developing telencephalon: pulse-labeling chick embryos with bromodeoxyuridine. **The Journal of Neuroscience** 20: 8021–8030, 2000.

TAVERNARI, F.C.; MENDES, A.M.P. Desenvolvimento, crescimento e características do sistema digestório de aves. **Revista Eletrônica Nutritime** 6: 1103-1115, 2009.

TUCKER, A.S. Salivary gland development. **Seminars in Cell and Development Biology** 18: 237-244, 2007.

UNI, Z. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science** 82: 1747–1754, 2003.

UNI, Z. et al. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **British Poultry Science** 41: 544–551, 2000.

VAN DEN BRINK, G. R. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. **Physiological Review** 87: 1343-1375, 2007.

WALTON, K.D. et al. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. **Development** 143: 2261-2272, 2016b.

WALTON, K.D. et al. Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. **Development** 143: 427-436, 2016a.

WANG, J.; LAURIE, G.W. Organogenesis of the exocrine gland. **Development Biology** 273: 1-22, 2004.