

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 NA MORFOGÊNESE DA MUCOSA
GASTROESOFÁGICA DE *Gallus gallus* (LINNAEUS, 1758)**

ADRIANA VENTURA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 NA MORFOGÊNESE DA MUCOSA
GASTROESOFÁGICA DE *Gallus gallus* (LINNAEUS, 1758)**

ADRIANA VENTURA

Sob a Orientação da Professora

Nadja Lima Pinheiro

e Co-orientação da Professora

Aparecida Alves do Nascimento

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em**
Ciências, no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ADRIANA VENTURA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração em morfologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/02/2013



Dra. Nadja Lima Pinheiro
(Orientadora)



Dr. Walker André Chagas. Livre Docente. UFF



Prof. Dra. Rosa Maria Marcos Mendes - UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, em especial as minhas vovós, mamãe e Lulu; e a todos os professores que me cativaram por sua excelência profissional e desta forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado do trabalho, parceria e colaboração de todos da área de Embriologia e Histologia, por isso sinceramente agradeço ao coordenador Dr. Prof. Armando Sales, Dr. Prof. Marco Antônio, Dr. Prof. André, Dra. Profa. Rosa Maria, a nossa queridíssima Ilza Coelho, ao Sr. Oséias, todos os estagiários e monitores da área, em especial Cintia Morgado e Bartolomeu das Neves.

À Dra. Profa. Nadja Lima Pinheiro pela orientação neste projeto, por todos os ensinamentos, pela contribuição profissional e pessoal, pela confiança depositada em mim, paciência, amizade e carinho.

À Dra. Profa. Aparecida Alves do Nascimento pela co-orientação, por tudo que me ensinou nestes últimos três anos, pela ajuda fundamental neste estudo, por viabilizar a realização deste projeto juntamente com a área, pela contribuição, incentivo, confiança, parceria e amizade.

À Sandrine pela gentileza de pesquisar e enviar artigos indisponíveis gratuitamente aqui no Brasil.

Aos queridos amigos conquistados nesta etapa da minha vida, em especial Vinicius Miranda, Márcia Souza, Juliana Santos, Mayara Martins, Maíra Santana, Isabela Schwan e Danielle Vieira-Lopes.

Às amigas Michelle Hipólito e Isabela Castro que me acompanharam e estiveram ao meu lado desde os primeiros anos de graduação, sempre pacientemente me ajudando e apoiando. Obrigada por toda amizade e carinho.

Aos alunos que participaram desta etapa e sempre foram um grande incentivo para escolha deste caminho.

À minha família por todo amor, apoio e compreensão mesmo com a distância.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, aqui citados ou não pela falta de memória.

LISTA DE ABREVIACOES

a.C.	antes de Cristo
AB	Alcian Blue
Ac	Anticorpo
CNC	Crista neural Cranial
DAB	Diaminobenzidina
e.g.	<i>exempli gratia</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAGs	Glicosaminoglicanas
HE	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
IR	Imunorreativo (a)
Mdm2	Murine double two minite
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PS	Fosfatidilserina
SV40	Simian vacuolating virus 40
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand

LISTA DE FIGURAS

Ilustração 1. Membranas embrionárias ou anexos fetais	10
Ilustração 2. Estádios do desenvolvimento do embrião de galinha	11
Ilustração 3. Fotografia do esôfago, proventrículo e moela de <i>G. gallus domesticus</i>	13
Ilustração 4. Diagrama para ilustrar as características morfológicas de apoptose.....	54
Ilustração 5. Regulação da p53 por Mdm2	57
Ilustração 6. Representação do método imuno-histoquímico ABC	59
Tabela 1. Resultados das reações histoquímicas no esôfago de <i>G. gallus</i>	18
Tabela 2. Resultados das reações histoquímicas no proventrículo de <i>G. gallus</i>	19
Tabela 3. Resultado das reações histoquímicas na moela de <i>G. gallus</i>	20
Figura 1. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo, mm: muscular da mucosa Barra: 100µm.....	21
Figura 2. Fotomicrografia esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	21
Figura 3. Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 44 (18 dias). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Egl: Glândula esofágica. Barra: 50µm.	22
Figura 4. Fotomicrografia das glândulas esofágicas em formação no estágio 45 (20 dias). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Egl: Glândula esofágica, ct: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm. .	22
Figura 5. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Células da mucosa positivas ao PAS. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.	23
Figura 6. Esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Células do epitélio de revestimento da mucosa e poucas células das glândulas esofágicas positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.	23
Figura 7. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 18 dias (estágio 44). Glândula esofágica em fase final da diferenciação, positiva ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	24

Figura 8. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 20 dias (estágio 45). Glândula esofágica positiva ao PAS. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.	24
Figura 9. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Células superficiais da mucosa positiva ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100µm.	25
Figura 10. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 15 dias (estágio 41). Células superficiais da mucosa positivas ao AB e glândulas esofágicas negativas. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100µm.....	25
Figura 11. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Células da mucosa e da glândula primordial positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	26
Figura 12. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 20 dias (estágio 45). Células da mucosa e das glândulas esofágicas positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100µm.....	26
Figura 13. Fotomicrografia do embrião com 12 dias de incubação (estádio 37 e 38). Mucosa e glândulas proventriculares revestidas por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular. Barra: 100µm.	27
Figura 14. Fotomicrografia de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37-38). Mucosa e glândula proventricular primordial revestidas por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50µm.....	27
Figura 15. Fotomicrografia de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37-38). Glândulas proventriculares primordiais do tipo simples e tubular. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Setas: Células binucleadas. Barra: 50µm....	28
Figura 16. Fotomicrografias de embrião de 13 dias (estádio 39). As glândulas proventriculares ramificadas, revestidas por epitélio simples cúbico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc: Ducto excretor, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50µm.	28
Figura 17. Fotomicrografia de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa revestida por epitélio simples cilíndrico mucossecretor. Glândulas proventriculares bem ramificadas. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50µm.	29
Figura 18. Fotomicrografia de embrião de 19 dias (estádio 45). Muscular da mucosa pouco evidente. Glândulas proventriculares presente na camada mucosa /submucosa. Coloração: Tricrômico de Gomori. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc:	

Ducto excretor, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa, Setas: muscular da mucosa. Barra: 100µm.....	29
Figura 19. Fotomicrografia de embrião de 12 dias (estádio 37 e 38). Mucosa proventricular positiva ao PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50µm.....	30
Figura 20. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa positiva à técnica de PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc: Ducto excretor central. Barra: 100µm.	30
Figura 21. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 17 dias (estádio 43). Secreção das glândulas proventriculares fracamente positivas à técnica de PAS. Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50µm.	31
Figura 22. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 19 dias de incubação (estádio 45). Mucosa positiva à produção de GAGs neutras, principalmente pelo epitélio secretor (PAS). Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50µm.	31
Figura 23. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 12 dias de incubação (estádio 37 - 38). Mucosa do proventrículo positiva à produção de GAGs neutras, principalmente pelo epitélio superficial. Técnica: PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50µm.....	32
Figura 24. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa positiva à técnica de AB. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 100µm.	32
Figura 25. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 19 dias (estádio 45). Mucosa positiva à técnica de AB pH 2,5. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 100µm.	33
Figura 26. Fotomicrografia da moela de embrião de 12 dias (estádio 37 - 38). Mucosa revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, V: vaso sanguíneo. Barra: 50µm.	33
Figura 27. Fotomicrografia da moela de embrião de 14 dias (estádio 40). Camada mucosa da moela revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio. Barra: 100µm.....	34
Figura 28. Fotomicrografia da moela de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa em fase de reorganização para formar as glândulas tubulares. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Cabeça de setas: Espaços intercelulares ou lacunas. Barra: 100µm.....	34

Figura 29. Fotomicrografia da moela de embrião com 17 dias de desenvolvimento (estádio 43). Camada mucosa com glândulas tubulares já formada. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Cabeça de setas: Ductos das glândulas retas. Barra: 50µm.....	35
Figura 30. Fotomicrografia da moela de embrião com 20 dias de incubação (estádio 45). Camada mucosa com glândulas tubulares bem formadas. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, CMus: Camada Muscular. Barra: 50µm.	35
Figura 31. Fotomicrografia da moela de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37/38). Mucosa positiva à produção de GAGs neutras. Técnica: PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	36
Figura 32. Fotomicrografia da moela de embrião de 16 dias (estádio 42). Glândulas tubulares primordiais positivas à técnica de PAS. Gl: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	36
Figura 33. Fotomicrografia da moela de embrião com 17 dias de incubação (estádio 43). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	37
Figura 34. Fotomicrografia da moela embrião de 12 dias (estádio 37/38). Mucosa positiva à técnica de AB na superfície apical. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.	37
Figura 35. Fotomicrografia da moela de embrião de 13 dias (estádio 39). Mucosa positiva à técnica de AB. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.	38
Figura 36. Fotomicrografia da Meola de embrião com 17 dias de incubação (estádio 43). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de AB. Gl: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.....	38
Figura 37. Fotomicrografia da moela de embrião com 19 dias de incubação (estádio 45). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de AB. Gl: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo, (*): Células epiteliais se soltando. Barra: 50µm.	39
Figura 38. Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 39 (13 dias), ausência de células IR à p53 na glândula esofágica primordial. Ep = Epitélio, Egl = Glândula esofágica, tc = Tecido conjuntivo. Barra = 50µm.	62
Figura 39. Fotomicrografia do esôfago de embrião no estágio 41 (16 dias). Células IR à p53 na mucosa. Ep = Epitélio, Setas= células imunorreativas. Barra = 50µm.	62
Figura 40. Fotomicrografia do esôfago de embrião no estágio 45 (19 dias) com células IR ao anticorpo anti-p53 no epitélio superficial (A e B). Setas = células imunorreativas. Barra = 50µm.....	63

- Figura 41.** Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 44 (19 dias) com células imunorreativas ao anticorpo anti-p53 no epitélio de revestimento e na glândula esofágica primordial (A, B e C). Setas= células imunorreativas. Barra = 50µm. 63
- Figura 42.** Fotomicrografia do proventrículo de embriões no estágio 37 (12 dias) com células IR à p53 soltas no lúmen (A). Células IR na mucosa em embriões no estágio 39 (B) e 41 (C). Setas = células imunorreativas. Barra = 50µm. 64
- Figura 43.** Fotomicrografia do proventrículo de embriões no estágio 44. Região de transição entre o proventrículo e a moela com células imunorreativas no epitélio superficial. Setas = células imunorreativas. Barra = 50µm. 64
- Figura 44.** Fotomicrografia da moela de embriões *G. gallus* no estágio 42 (16 dias) com células IR à p53 na mucosa (A e B). Setas = Células IR. Barra = 50µm. 65
- Figura 45.** Fotomicrografia da moela de embriões *G. gallus* no estágio 42 (16 dias) com células IR à p53 no epitélio superficial e células mesenquimais subjacentes em A, B e C. Célula IR com núcleo fragmentado (D). Célula IR demonstrando o núcleo fragmentado, corado em castanho. Setas e cabeça de setas= Células IR. Barra = 50µm. 65
- Figura 46.** Fotomicrografia da moela de embriões no estágio 44 (18 dias) com células IR nos espaços intercelulares na mucosa. Setas = Células IR. Barra = 50µm. 66
- Figura 47.** Fotomicrografia da moela de embriões no estágio 45 (19 dias) com células IR nos espaços intercelulares na mucosa. Setas= Células IR. Barra = 50µm. 66
- Figura 48.** Fotomicrografia do controle timo de *G. gallus* (adulto) é recoberto por delgada cápsula de tecido conjuntivo (C) que invagina para interior do órgão formando septos, dividindo o órgão em lóbulos (L). Cada lóbulo apresenta uma região cortical e medular, nesta última encontram-se os corpúsculos tímicos. Coloração: HE. R. Cortical= região cortical, L = lóbulos; C = cápsula; (seta) = corpúsculo tímico. Corado com Hematoxilina e Eosina. Barra = 50µm. 67
- Figura 49.** Fotomicrografia do timo de *G. gallus* (adulto). O controle positivo demonstrou células IR à p53 principalmente na região cortical (A e B). Núcleos dos linfócitos IR à p53. R. Cortical= região cortical, R. Medular = região medular. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50µm. 67
- Figura 50.** Fotomicrografias do timo de galinha. Controle negativo com ausência de células IR à p53. R. Cortical= região cortical, R. Medular = região medular. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50µm. 68
- Figura 51.** Fotomicrografia do tumor de mama humano. O controle positivo com células IR-p53. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 100µm. 69

Figura 52. Fotomicrografia do tumor de mama humano em maior aumento (A) com célula IR-p53. Célula IR com núcleo corando em castanho (B). Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50µm..... 69

Figura 53. Fotomicrografia de cortes de tumor de mama humano. Controle negativo ausência de células IR-p53. Contracorados pela Hematoxilina de Harris. Barra = 100µm..... 70

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	IV
LISTA DE FIGURAS	V

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	1
-------------------------	----------

1.1. JUSTIFICATIVA	1
1.2. OBJETIVOS	2
1.2.1. OBJETIVO GERAL	2
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1.3. HIPÓTESES	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

CAPITULO I	6
-------------------------	----------

RESUMO	7
--------------	---

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Embriologia das Aves	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Coleta dos embriões	15
3.2 Colorações Histológicas de Rotina	15
3.2.2. Hematoxilina e Eosina	15
3.2.3. Tricrômico de Gomori	15
3.3. Técnicas Histoquímicas	16
3.3.2. Ácido Periódico de Schiff – PAS	16
3.3.3. Alcian Blue pH 2.5	16
3.4. Observações e fotomicrografias	16
4 RESULTADOS	17
4.1 Esôfago	17
4.2 Estômago	17
4.2.1 Proventrículo	17
4.2.2 Moela	19
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CAPITULO II	47
--------------------------	-----------

RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	52
2.1 Morte celular por apoptose.....	52
2.2 Proteína p53.....	55
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Coleta dos embriões	58
3.2 Processamento tecidual e análise histológica.....	58
3.3 Observações e fotomicrografias	58
3.4 Imuno-histoquímica.....	58
4. RESULTADOS	60
4.1 Esôfago.....	60
4.2 Proventrículo	60
4.3 Moela.....	61
4.4 Controles	61
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	74
ANEXOS	79
A. Parecer da Comissão de Ética.....	79
B. Anticorpo primário anti-p53.....	80
C. Diluente	81
D. Kit ABC.....	82
E. Cromógeno DAB.....	85

VENTURA, Adriana. **A expressão da proteína p53 na morfogênese da mucosa gastroesofágica de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

RESUMO

A ontogênese da mucosa gastroesofágica envolve alterações morfológicas de acordo com a sua estrutura e função de cada órgão, orquestrados por eventos como a proliferação, diferenciação e apoptose. A proposta deste estudo foi descrever a morfogênese da mucosa gastroesofágica de *G. gallus*, identificar as alterações no padrão de secreção de glicosaminoglicanas (GAGs), analisar a expressão da proteína p53 e correlacioná-la às alterações morfológicas durante o desenvolvimento. Foram utilizados 38 embriões de galinha, classificados nos estádios 37 a 45, segundo Hamburger e Hamilton (1951). O material coletado foi processado segundo rotina histológica e submetidos às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina para análise da estrutura tecidual e tricrômico de Gomori para identificação do tecido conjuntivo e sobre tudo as fibras colágenas; e às técnicas histoquímicas do PAS e AB pH 2,5 para análise de GAGs neutros e ácidos, respectivamente. Para técnica de imunohistoquímica foram utilizados 26 espécimes, sendo 24 embriões e o timo de 2 animais adultos. O epitélio de revestimento da mucosa gastroesofágica foi identificado como mucossecretor, sendo no esôfago principalmente nos estádios iniciais, decrescendo com o desenvolvimento. As glândulas esofágicas e proventriculares começam a se formar nos estádios iniciais do desenvolvimento (estádio 37), quanto na moela às glândulas tubulares iniciam a sua formação somente após o 15º dia de incubação (estádio 41). A proteína p53 é expressa em momentos cruciais do desenvolvimento, no esôfago (durante a remodelação das células para formar as glândulas esofágicas, estágio 42 até 45), no proventrículo (enquanto o epitélio da mucosa se diferencia (estádio 39 ao 45) e na moela (durante a formação das glândulas tubulares, estágio 42 ao 45). A expressão da p53 na mucosa gastroesofágica ocorre principalmente nos estádios que iniciam a remodelação tecidual e acompanham a diferenciação destas células até a formação de estruturas glandulares com características semelhantes às observadas no animal adulto. As diferenças na produção de GAGs nessas regiões do trato digestório estão relacionadas aos avanços do desenvolvimento nos estádios de desenvolvimento, às funções e necessidades fisiológicas de cada segmento e à adaptação progressiva do organismo à vida pós-eclosão.

Palavras-chave: Embriões de galinha, glicosaminoglicanas, proteína p53.

VENTURA, Adriana. **The expression of protein p53 in the morphogenesis of the gastroesophageal mucosa of *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

ABSTRACT

The ontogenesis of the gastroesophageal mucosa involves morphological changes that vary according to the structure and function of each organ and events such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. The aim of this study was to describe the histogenesis of the gastroesophageal mucosa of *G. gallus*, identify the alterations in the secretion pattern of glycosaminoglycans (GAGs), analyze the expression of protein p53 and correlate it with the morphological changes during development. Thirty-eight chicken embryos were used, classified as in stages 37 to 45 according to Hamburger and Hamilton (1951). The material collected was processed according to routine histological techniques and stained with hematoxylin-eosin for analysis of the tissue structure, with Gomori's trichrome for identification of the conjunctive tissue and mainly collagen fibers, as well as with the histochemical techniques PAS and AB pH 2.5 for analysis of neutral and acid GAGs, respectively. For the immunohistochemical technique, 26 specimens were used, 24 embryos and the thymus of 2 adult animals. The epithelium covering the gastroesophageal mucosa was found to secrete mucus, while in the esophagus, the mucosa only secreted mucus in the initial stages of development. The esophageal and proventricular glands start to form in the initial stages of development (stage 37), while in the gizzard the tubular glands start to form only after the 15th day of incubation (stage 41). The differences in production of GAGs in these regions of the digestive tract are related to the advancement of morphogenesis in the developmental stages, the functions and physiological needs of each segment and the progressive adaptation of the organism to life after hatching. Protein p53 was expressed at crucial moments of development, in the esophagus (during remodeling of the cells to form the esophageal glands, stage 42 to 45), in the proventriculus (during differentiation of the mucosal epithelium, stage 39 to 45) and in the gizzard (during formation of the tubular glands, stage 42 to 45). The expression of p53 in the gastroesophageal mucosa occurs mainly in the stages when tissue remodeling starts and accompanies the differentiation of these cells until formation of glandular structures with characteristics similar to those in the adult bird. The differences in the production of GAGs in these regions of the gastroesophageal tract are related to development stages, functions, and physiological requirements of each segment, and to the gradual adjustment of the body to the post-hatching life.

Keywords: Chicken embryos, glycosaminoglycans, protein p53.

INTRODUÇÃO

A ontogênese envolve uma série de eventos como a proliferação e apoptose para resultar no desenvolvimento normal do embrião. Logo após a fecundação, o zigoto passa por sucessivas divisões mitóticas, levando a um rápido aumento do número de células, caracterizando o início da proliferação celular e origem de um organismo multicelular. No entanto, essas células precisam migrar para regiões específicas do embrião e se diferenciar, ou seja, se especializar em uma determinada função, tecido e órgão (SCOTT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Mas, no decorrer do processo ontogênico, algumas destas células se tornam desnecessárias, sendo eliminadas por um processo chamado de apoptose ou morte celular programada (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; MEIER *et al.*, 2000).

A morte celular foi descrita pela primeira vez por Vogt em 1842 (VAUX, 2002; ZAKERI & LOCKSHIN, 2007) e reconhecida como um fenômeno normal durante desenvolvimento por Gluscksman (1951 apud JACOBSON *et al.*, 1997) e Sauders (1966). Em 1972, Kerr, Wyllie & Currie introduziram o termo apoptose para descrever a morte celular fisiológica como um fenômeno biológico fundamental.

Durante a ontogênese, o processo de apoptose pode ocorrer devido à falta de fatores de crescimento ou estímulos específicos da matriz extracelular. A falta desses fatores pode levar a ativação de sinalizadores pró-apoptóticos, como a proteína p53 (ENTEZARI; ZAKERI; LOCKSHIN, 2010). Descoberta em 1979 por Lane & Crawford e Linzer & Levine (LEVINE & OREN, 2009), a p53 já foi descrita na ontogênese de várias espécies animais, durante a gastrulação, neurogênese, miogênese esquelética, adipogênese (WALLINGFORD *et al.*, 1997; KRINKA *et al.*, 2001; MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Relacionada a processos de diferenciação, participa ativamente do desenvolvimento de camundongos, entretanto, apesar disso a p53 pode ser considerada dispensável nesta fase (MOLCHADSKY *et al.*, 2008), porém outras espécies como *Xenopus laevis* desempenha um papel fundamental (WALLINGFORD *et al.*, 1997). Sua expressão também foi descrita em embriões de zebrafish (MOLCHADSKY *et al.*, 2008) e galinha (KRINKA *et al.*, 2001, RINON *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento, a morte celular por apoptose dá forma a órgãos, esculpindo-os, abrindo lúmens, retirando células excedentes e características ancestrais desnecessárias na vida adulta (SAUDERS, 1966; MEIER *et al.*, 2000, ENTEZARI; ZAKERI; LOCKSHIN, 2010). A apoptose é um mecanismo essencial para o sucesso da ontogênese (DANIAL & KORSMEYER, 2004), genes pró-apoptótico como o *p53* podem atuar durante o desenvolvimento, reconhecido em diferentes espécies durante a morfogênese de vários tipos celulares (WALLINGFORD *et al.*, 1997, KRINKA *et al.*, 2001, MOLCHADSKY *et al.*, 2008, LU; AMATRUDA e ABRAMS, 2009; RINON *et al.*, 2011).

Como a ontogênese compreende mudanças morfológicas para que órgãos adquiram a forma padrão e funcional, essas alterações são controladas por genes como o p53. A proposta deste estudo foi descrever histogênese da mucosa gastroesofágica de *Gallus gallus domesticus*, assim como identificar a secreção de glicosaminoglicanas (GAGs) e mudanças no padrão de secreção durante a formação de tecidos glandulares, além de correlacionar estas alterações morfológicas à expressão da proteína p53 durante a ontogênese da mucosa destes segmentos do tubo digestivo.

1.1. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da galinha foi documentado pela primeira vez por Aristóteles no século IV a. C. (HAMBURGUER & HAMILTON, 1951; HYTTEL; SINOWATZ;

VEJSTED, 2012). Desde então, este tem sido o organismo modelo de inúmeros estudos embriológicos (e.g. HAMBURGUER e HAMILTON, 1951; TONER, 1965, 1966; PINHEIRO *et al.*, 1989; MÜLLER & DIAS, 1998; TAKIGUCHI; YASUGI; MIZUNO, 1988; SGAMBATI *et al.*, 1995, 1996; ROBERTS *et al.*, 1998; FUKUDA & YASUGI, 2005; LEKSRISOMPONG *et al.*, 2007).

O embrião de *G. gallus* representa um excelente modelo do desenvolvimento, proporcionando um sistema biológico para pesquisas científicas, permitindo o uso de técnicas para testar a ativação ou perda da função de genes expressos durante o desenvolvimento (VERGARA & CANTO-SOLER, 2012). Como o seu desenvolvimento é padronizado em estádios bem definidos, permite comparações entre estudos (HAMBURGUER & HAMILTON, 1951). Outras vantagens incluem a manipulação experimentalmente, um desenvolvimento semelhante ao de outros vertebrados, incluindo humanos (VERGARA & CANTO-SOLER, 2012), a facilidade na obtenção de ovos e manutenção do desenvolvimento em incubadoras (MÜLLER e DIAS, 1998; VERGARA & CANTO-SOLER, 2012; HYTTTEL; SINOWATZ; VEJSTED, 2012; XU *et al.*, 2012).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever a morfogênese da mucosa gastroesofágica de embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus*), identificando as células e tecidos glandulares produtores de glicosaminoglicanas neutras e ácidas, além de correlacionar as características morfológicas do desenvolvimento da mucosa gastroesofágica com a expressão da proteína p53.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever histologicamente a morfogênese da mucosa gastroesofágica e caracterizar alterações histoquímicas decorrentes do desenvolvimento.
- ✓ Analisar a expressão da proteína p53 durante a ontogênese da mucosa gastroesofágica de *G. gallus* e identificar os segmentos da mucosa e estádios em que ocorre a expressão da p53.

1.3. HIPÓTESES

- ✓ As alterações histológicas durante a morfogênese da mucosa gastroesofágica são acompanhadas por alterações nos padrões de secreções de GAGs.
- ✓ A proteína p53 participa do desenvolvimento da mucosa gastroesofágica de *G. gallus*.
- ✓ A p53 é expressa principalmente nos estádios iniciais do desenvolvimento da mucosa gastroesofágica, decrescendo nos estádios mais avançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219.

ENTEZARI, M.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Apoptosis in Developmental Processes. **eLS**, 2010.

FUKUDA, K.; YASUGI, S. The molecular mechanisms of stomach development in vertebrates. **Development, growth e differentiation**, v. 47, n. 6, p. 375-382, 2005.

GLUCKSMAN, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Review*, v. 26, p. 59-86, 1951 apud JACOBSON M. D.; WEIL M.; RAFF M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1ª ed., Elsevier, 383 p., 2012.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KRINKA, D.; RAID, R.; PATA, I.; KÄRNER, J.; MAIMETS, T. In situ hybridisation of chick embryos with p53-specific probe and their immunostaining with anti-p53 antibodies. **Anatomy and embryology**, v. 204, n.3, p. 207-215, 2001.

LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P. W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry science**, v. 86, n. 12, p. 2685-2691, 2007.

LEVINE, A. J.; FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; DRIVE, M.; CAROLINA, N. P53 is a Tumor Suppressor Gene. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 67-70, 2004.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749-58, 2009.

LU, W.-J.; AMATRUDA, J. F.; ABRAMS, J. M. P53 Ancestry: Gazing Through an Evolutionary Lens. **Nature reviews Cancer**, v. 9, n.10, p. 758-762, 2009.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.

MOLCHADSKY, A.; SHATS, I.; GOLDFINGER, N.; PEVSNER-FISCHER, M.; OLSON, M.; RINON, A.; TZAHOR, E.; LOZANO, G.; ZIPORI, D.; SARIG, R.; ROTTER, V. P53

Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a Cell Fate Dependent Manner. **Plos One**, v. 3, n. 11, p. e3707, 2008.

MÜLLER, Y. M. R.; DIAS, P. F. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n 5, p. 233-233, 1998.

PINHEIRO, N. L.; GEORGE, L. L.; MOTA, D. L. Histogenesis and histochemistry of the secretion plate: detection of glycans and neutral glycoproteins synthesized by epithelial components of the gizzard mucosa of *Gallus gallus*. **Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch**, v.135, n. 3, p. 385-395, 1989.

RINON, A.; MOLCHADSKY, A.; NATHAN, E.; YOVEL, G.; ROTTER, V.; SARIG, R.; TZAHOR, E. p53 coordinates cranial neural crest cell growth and epithelial-mesenchymal transition / delamination processes. **Development**, v. 138, p. 1827–1838, 2011.

ROBERTS, D. J.; SMITH, D. M.; GOFF, D. J.; TABIN, C. J. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. **Development** (Cambridge, England), v. 125, n. 15, p. 2791-801, 1998.

SAUNDERS, J. W. Death in embryonic systems. **Science**, v. 154, n. 3749, p. 604-12, 1966.

SCOTT, G. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5ª ed., Funpec Editora, Ribeirão Preto-SP, 2003.

SGAMBATI E.; BRYK, S. G.; GHERI, G. Histochemical study of the epithelial mucins in the gizzard of the chick embryo. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 101, n. 3, p. 173-185, 1996.

SGAMBATI, E., BRYK, S. G., GHERI, G. Histochemical characterization of the mucins of the epithelial cells in the chick embryo proventriculus. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 100, n. p. 83-97, 1995.

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. **Evolution e development**, v. 2, p. 6, p. 348-59, 2000.

TAKIGUCHI, K.; YASUGI, S.; MIZUNO, T. Developmental changes in the ability to express embryonic pepsinogen in stomach epithelia of chick embryos. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 56-62, 1988.

TONER, P. G. Development of the acid secretory potential in the chick embryo proventriculus. **Journal of Anatomy**, v. 99, n. 2, pp 389-398, 1965.

TORNER, P. G. Ultrastructure of the developing gizzard epithelium in the chick embryo. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 73, n. 2, p. 220-233, 1966.

VAUX, D. L. Apoptosis Timeline. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 349-354, 2002.

VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural development**, v. 7, n. 1, p. 22, 2012.

WALLINGFORD, J.B.; SEUFERT, D. W.; VIRTA V. C.; VIZE, P. D. p53 activity is essential for normal development in *Xenopus*. **Current Biology**, v. 7, n. 10, p. 747-757, 1997.

XU, J.; DELPROPOSTO, Z.; ZHOU, Z.; SHEN, H.; XUAN, S. Y.; LI, Q. H.; HAACKE, E. M.; HU, J. In ovo monitoring of smooth muscle fiber development in the chick embryo: diffusion tensor imaging with histologic correlation. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e34009, 2012.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Cell Death: History and Future. Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 1-11, 2007.

CAPITULO I

MORFOGÊNESE DA MUCOSA GASTROESOFÁGICA DE *Gallus gallus* (LINNAEUS, 1758)

VENTURA, Adriana. **Morfogênese da mucosa gastroesofágica de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia Animal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

RESUMO

Este estudo objetivou descrever a histogênese do epitélio mucossecretor e glândulas do esôfago, proventrículo e moela de *Gallus gallus*, além de identificar as alterações no padrão de secreção de glicosaminoglicanas (GAGs). Foram utilizados 38 embriões de galinha, o material coletado foi processado segundo rotina histológica e posteriormente corado por hematoxilina-eosina para análise da estrutura tecidual e com tricrômico de Gomori para identificação do tecido conjuntivo e das fibras colágenas; e realização das técnicas histoquímicas de PAS e AB para análise de GAGs neutras e ácidas, respectivamente, e para identificação do início da função de tecidos glandulares primordiais. Os embriões em estádios mais avançados do desenvolvimento apresentaram a parede do esôfago constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, enquanto o proventrículo mostrou-se constituído pelas camadas: lâmina própria/submucosa, muscular e serosa; e a moela por mucosa, muscular e serosa. As glândulas esofágicas encontram-se presentes e em formação desde os estádios iniciais (12 dias de incubação – estágio 37/38). As glândulas proventriculares começam a se formar a partir do 13º dia de desenvolvimento (estádios 39), enquanto na moela as glândulas tubulares iniciam a sua formação somente após o 15º dia (estádio 41). As diferenças na produção de GAGs nessas regiões do trato gastroesofágico estão relacionadas aos estádios de desenvolvimento, às funções e necessidades fisiológicas de cada segmento e à adaptação progressiva do organismo à vida pós-eclosão.

Palavras-chave: Embriões de galinha, desenvolvimento, glicosaminoglicanas.

VENTURA, Adriana. **Morphogenesis of the gastroesophageal mucosa of *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

ABSTRACT

The ontogenesis of the gastroesophageal mucosa involves morphological alterations related to its structure and the function of each segment. The present study describes the histogenesis of the mucus-secreting epithelium and glands of the esophagus, gizzard, and proventriculus of the chicken (*Gallus gallus*), and identifies alterations in the secretion pattern of glycosaminoglycan (GAGs). We analyzed 38 chicken embryos, processed the material collected following the histological routine, and then stained it with hematoxylin-eosin for the analysis of tissue structure and with Gomori's trichrome for the identification of conjunctive tissue and collagen fibers. We used the PAS histochemical technique for the analysis of neutral GAGs and the AB histochemical technique for the analysis of acid GAGs. The embryos at late stage of development had the esophagus wall composed of four layers: mucosa, submucosa, muscle, and serosa, whereas the proventriculus showed composed of layers: lamina propria/submucosa, muscle, and serosa; and gizzard composed of three layers: mucosa, muscle and serosa. In all three segments, we identified the superficial epithelium as mucus-secreting; in the esophagus this epithelium was mucus-secreting only at the initial development stages. The proventricular glands began to form at the initial development stages, whereas the tubular glands began to form in the gizzard just after the 15th day. The differences in the production of GAGs in these regions of the gastroesophageal tract are related to development stages, functions, and physiological requirements of each segment, and to the gradual adjustment of the body to the post-hatching life.

Keywords: chicken embryos, development, glycosaminoglycans.

1. INTRODUÇÃO

O trato digestivo (TD) dos embriões de *G. gallus* inicia o seu desenvolvimento nos primeiros dias de incubação, representado por um tubo simples e indiferenciado. O intestino anterior dá origem ao esôfago, papo, estômago, intestino e glândulas anexas (NIELSEN *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 1998; FUKUDA & YASUGI, 2005). Entre o terceiro e o quarto dias de desenvolvimento embrionário, o estômago do embrião começa a se diferenciar em duas regiões morfológicamente distintas. No sexto dia, o proventrículo e a moela já são anatomicamente distintos (TONER, 1965; TAKIGUCHI; YASUGI; MIZUNO, 1988; FUKUDA & YASUGI, 2005).

A mucosa do esôfago das aves é caracterizada por ser pregueada e apresentar glândulas mucosas na lâmina própria (Banks, 1992). O estômago das aves consiste em duas regiões histológica e fisiologicamente distintas: uma porção glandular, ou proventrículo, e a porção muscular, ou moela (HODGES, 1974; TONER, 1965; TAKIGUCHI *et al.*, 1988; LIMAN *et al.*, 2010). Localizado anteriormente, o proventrículo é responsável pela digestão péptica, e é caracterizado histologicamente por ser revestido internamente por células cilíndricas mucossecretoras e conter inúmeras glândulas ramificadas no tecido conjuntivo, formadas por células oxintopépticas que secretam tanto o ácido clorídrico quanto o pepsinogênio (HODGES, 1974; AKSOY; CINAR, 2009). A moela representa a região posterior do estômago, caracterizada por apresentar uma placa de secreção na superfície interna e uma camada de músculo bem desenvolvida. Ambas as características representam uma adaptação à maceração de grãos (NIELSEN *et al.*, 2001; FUKUDA & YASUGI, 2005; LIMAN *et al.*, 2010).

A ontogênese da mucosa gastroesofágica envolve alterações morfológicas, sendo que esta difere em cada segmento do TD, de acordo com a estrutura e função do órgão. Assim, a proposta deste estudo foi descrever a morfogênese da mucosa gastroesofágica de *G. gallus* e identificar as alterações nas secreções em células e glândulas durante sua formação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriologia das Aves

O desenvolvimento embrionário das aves se dá externamente ao corpo da fêmea (GONZALES *et al.*, 2003), consistindo em um excelente sistema biológico para estudo, pois muitos eventos ontogênicos que ocorrem assemelham-se aos de outras espécies animais, permitindo estudos durante o desenvolvimento (STERN, 2005; DE GROEF; GROMMEN; DARRAS, 2008). Este pode ser dividido em duas fases: antes da postura, enquanto o ovo ainda está no oviduto, e após a postura, o período de incubação. Os ovos das aves são do tipo telolécito completo, possuem grande quantidade de vitelo para assegurar o desenvolvimento do embrião, pois este não dependerá do organismo materno. A fecundação é interna e ocorre na porção mais superior do oviduto da fêmea. A clivagem é do tipo meroblática discoidal parcial (GONZALES *et al.*, 2003; SCOTT, 2003).

O desenvolvimento embrionário começa aproximadamente três horas após a fecundação, dura aproximadamente vinte e duas horas no interior do corpo da fêmea. O processo de clivagem inicia no momento em que o ovo entra no istmo, ao atingir o útero cinco horas depois, encontra-se no estágio de dezesseis células, chamado de mórula. A proliferação celular continua, formando o blastodisco, nas próximas horas. Em seguida, por meio de clivagens horizontais cria-se uma única camada de células contínuas, o blastoderma (PATTERSON, 1910; OLSEN, 1942). Este começa a se diferenciar em duas camadas germinativas, iniciando a gastrulação. No momento da postura, o embrião encontra-se na fase de blastoderme (ou blástula) ou em fase pré-gastrulação (GONZALES *et al.*, 2003; SCOTT, 2003). Após a oviposição, o ovo sofre um resfriamento e o embrião comporta-se como um organismo poiquilotermo, sofrendo direta influência do meio externo. Para que ocorra a continuidade da embriogênese que estará completa em vinte um dias é necessário à incubação dos ovos em temperatura ideal de aproximadamente 37,5° e umidade de 55-60%. (MÜLLER & DIAS, 1998; GONZALES *et al.*, 2003).

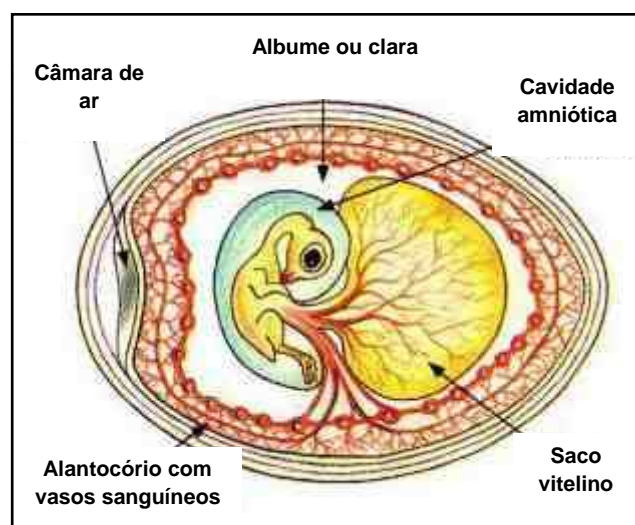


Ilustração 1. Membranas embrionárias ou anexos fetais. Fonte: Portal São Francisco <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-cordata/filo-chordata-21.php>>

As membranas embrionárias das aves presente no ovo representam adaptações especiais já que o embrião se desenvolverá no ambiente externo ao organismo da mãe. São elas o saco vitelino, o alantoide, o âmnio e o córion (GONZALES *et al.*, 2003), exemplificadas na (Ilustração 1).

O processo de incubação pode realizar-se com variações de temperatura, superiores ou inferiores a mais adequada à *G. gallus*. Uma pequena oscilação de temperatura pode alterar o padrão de desenvolvimento do organismo e a taxa de eclosão (MÜLLER & DIAS, 1998). Portanto, com a finalidade de evitar a perda da correlação entre a idade cronológica e estrutural, Hamburger & Hamilton (1951) propuseram um estadiamento do desenvolvimento normal de embriões de galinha (Ilustração 2), sugerindo uma forma de padronizar os experimentos realizados com este modelo biológico, sendo esta classificação frequentemente utilizada desde então. A classificação consiste em 46 estádios de desenvolvimento que inicia ainda nas primeiras horas pós-postura, na fase de blastoderma e segue até o vigésimo primeiro dia de incubação quando o embrião está totalmente formado. O objetivo do estadiamento proposto por Hamburger & Hamilton (1951) foi padronizar e classificar os embriões com base nos caracteres externos independentemente da raça, pois algumas se desenvolvem mais rápido.

O embrião de galinha inicia seu desenvolvimento poucas horas após a fecundação. No momento da postura, a maioria dos embriões encontra-se no estágio inicial de gastrulação (GONZALES *et al.*, 2003). O epitélio do sistema gastrointestinal é derivado do endoderma, enquanto o tecido conjuntivo, os componentes musculares, a cobertura serosa e os mesentérios são todos derivados do mesoderma. Os componentes nervosos são derivados da crista neural (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

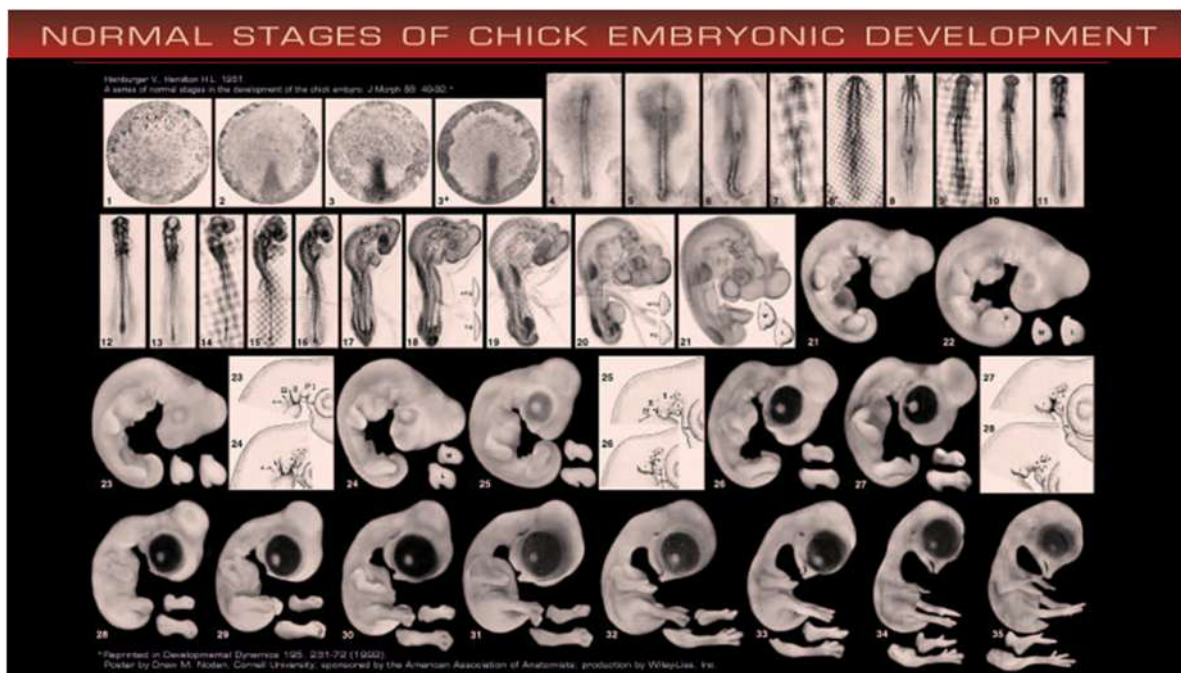


Ilustração 2. Estádios do desenvolvimento do embrião de galinha. Modificado de HAMBURGER & HAMILTON, 1951. Disponível em <http://www.summagallicana.it/lessico/e/embrione%20di%20pollo.htm>

Inicialmente, o trato gastrointestinal representa uma estrutura tubular simples e indiferenciada que posteriormente dará origem as regiões específicas que irão compor cada segmento, exibindo morfologia e histologia característica que lhes permitam desempenhar funções tais como digestão, absorção, secreção e excreção (KLASING, 1999; SMITH *et al.*, 2000; FUKUDA & YASUGI, 2005). No sexto dia de desenvolvimento, o estômago simples já se diferenciou em duas regiões distintas: o proventrículo e moela (TORNER, 1965). A formação do intestino primitivo ocorre ao longo de eixo ântero-posterior de forma semelhante a dos outros animais. O endoderma invagina em dois lugares dando origem ao intestino anterior e posterior, ventralmente, formando dois tubos abertos, que serão recobertos pelo mesoderma esplâncnico. Os tubos anterior e posterior se alongam até se fundirem formando um único tubo simples. O intestino primitivo inicia a diferenciação no intestino anterior com uma protuberância que dará origem ao estômago primitivo, mas logo se regionaliza dando origem ao esôfago, estômago e órgãos derivados, como pâncreas, fígado, glândula tireoide e pulmões. O intestino médio dá origem à porção delgada do intestino (duodeno, jejuno e íleo) e do intestino posterior deriva o colón, ceco e cloaca formando o intestino grosso (ROBERTS *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 2001; FUKUDA & YASUGI, 2005). Cada região do intestino antero-posterior é caracterizada por padrões únicos de mesoderma e endoderma que pode ser facilmente distinguido pela morfologia e histologia (SMITH *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001).

O esôfago da ave adulta é um tubo muscular estreito que se estende da glote, porção final da faringe passa através do pescoço e tórax para se juntar ao estômago glandular na cavidade abdominal (HODGES, 1974). Apresenta-se revestido por epitélio pavimentoso estratificado podendo ser ou não queratinizado, lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, onde podem ser observados nódulos e infiltrados de células linfóides, principalmente na região do papo. Na mucosa do esôfago estão presentes glândulas esofágicas mucosa do tipo túbulo-alveolares ramificadas, constituídas por células mucossecretoras (LANZIERI; SALES; VIEIRA, 1973; BANKS, 1991), cuja função é produzir continuamente uma fina camada de muco que lubrifica a superfície epitelial (HODGES, 1974; KIERSZENBAUM, 2008). A muscular da mucosa é formada por músculo liso, orientada longitudinalmente em relação ao eixo do lúmen. A camada submucosa, muscular e adventícia ou serosa são típicas (BANKS, 1991). O inglúvio ou papo representa um divertículo esofágico, que se apresenta pouco antes deste entrar no tórax. Caracteriza-se por ser mais espesso que o esôfago, porém, neste segmento, as glândulas mucosas são ausentes em galiformes. Funcionalmente, o esôfago serve para lubrificar e conduzir o alimento, enquanto a função do inglúvio é armazenar e macerar o alimento por meio de contrações da musculatura para depois liberá-lo no proventrículo (HODGES, 1974; BANKS, 1991).

O estômago da ave é composto pelo proventrículo ou estômago glandular e um estômago mecânico ou moela (Ilustração 2) que são estruturalmente e fisiologicamente distintos (TAKIGUCHI; YASUGI; MIZUNO, 1988).

O proventrículo é uma porção homóloga ao estômago de mamífero. Posterior ao proventrículo está à moela, região do estômago que se expande devido à hipertrofia da musculatura lisa da camada muscular (SMITH *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001).

O proventrículo é uma estrutura delicada quando comparada a moela, ligeiramente fusiforme que tem o desenvolvimento glandular visível na submucosa e camada muscular delgada (NIELSEN *et al.*, 2001). O proventrículo é o estômago glandular das aves, histologicamente organiza-se de acordo com o padrão geral típico do sistema digestivo, exceto pelas glândulas oxinticopépticas encontradas na submucosa. A mucosa é caracterizada

por pregas que formam sulcos. As glândulas mucosas se abrem na base dos sulcos, revestidos por epitélio simples cilíndrico. Os ductos principais das glândulas proventriculares são formados por uma camada de células idênticas as do epitélio superficial (LANZIERI; SALES; VIEIRA, 1973; BANKS, 1991). A lâmina própria pode apresentar numerosos acúmulos de tecidos linfóide nodular ou difuso. A camada muscular da mucosa constitui-se de fibras musculares lisas interrompidas e seus feixes encontram-se interdigitados nas glândulas proventriculares. Estas são do tipo composta, ramificada e tubular (BANKS, 1991).

No proventrículo encontram-se glândulas grandes e profundas na submucosa (AIKTEN, 1958). As células oxintopépticas revestem-nas e secretam tanto o ácido clorídrico como pepsinogênio (SMITH *et al.*, 2000). A camada de músculo liso é delgada formada por fibras musculares lisas, constituída por uma camada longitudinal interna, circular média e longitudinal externa. O órgão é revestido externamente por uma camada serosa. O proventrículo é separado da moela por um istmo, chamado de zona de transição (BANKS, 1991; NIELSEN *et al.*, 2001).

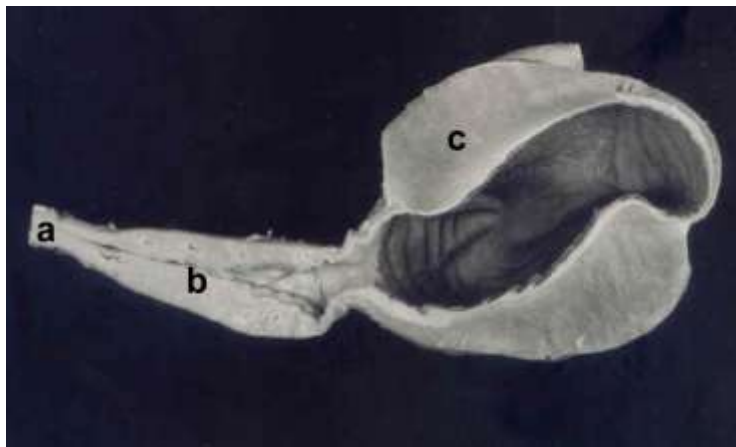
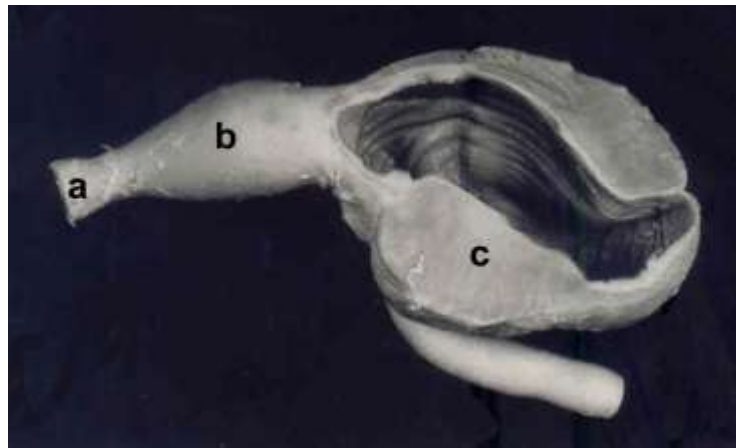


Ilustração 3. Fotografia do esôfago (a), proventrículo (b) e moela (c) de *G. gallus domesticus* (Fonte: Pinheiro, N. L.).

Na região de transição proventículo-moela há uma nítida demarcação entre estes órgãos pela espessa camada muscular presente na moela. A moela ou ventrículo constitui a porção mecânica do estômago. A superfície interna do órgão é revestida por uma secreção dura produzida pelas glândulas mucosas (BANKS, 1991; NIELSEN *et al.*, 2001). A camada mucosa é formada por epitélio simples cilíndrico com características mucossecretoras que se continuam no interior da glândula. O epitélio de revestimento da moela aprofunda-se na lâmina própria da mucosa, constituindo as glândulas tubulosas (LANZIERI; SALES; VIEIRA, 1973). A lâmina própria/submucosa é típica. A muscular da mucosa é formada por músculo liso e tecido conjuntivo denso. A camada serosa delgada (BANKS, 1991). A moela é adaptada para triturar e moer grãos, substituindo o processo de mastigação, principalmente nas espécies granívoras. A superfície epitelial apresenta-se queratinizada (SMITH *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos embriões

Foram coletados 38 embriões de *G. gallus* (raça Leghorn) com 12 a 20 dias de incubação, oriundos da Granja Tolomei, Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizados cinco embriões de 12 dias de incubação; quatro de 13 dias; cinco de 14 dias; quatro de 15 dias; três de 16 dias; cinco de 17 dias; quatro de 18 dias; quatro de 19 dias; e quatro embriões de 20 dias.

A incubação foi realizada em incubadora automática em temperatura de 37,5°C e umidade de 60%, ambas controladas. Os embriões foram eutanasiados por hipotermia (método de congelamento a 4°C por 4 horas), de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CRMV, protocolo 189/2011 processo 23011792/2011-31 aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da UFRRJ (anexo A).

Os embriões foram classificados em estádios, variando de 37 a 45, segundo Hamburger e Hamilton, 1951. Posteriormente, dissecados para retirada do esôfago, proventrículo e moela, os quais foram fixados em líquido de Bouin por 8 horas, em seguida processados pela técnica histológica de rotina, que consiste em: desidratação em série crescente de etanol (70° GL até 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Histosec-Paraffin para obtenção de cortes histológicos de 3µm.

3.2 Colorações Histológicas de Rotina

3.2.2. Hematoxilina e Eosina (Mallory, 1938)

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise da estrutura tecidual, tendo como resultado: núcleos em azul escuro a roxo, citoplasma e demais estruturas tissulares róseos.

Técnica de coloração: Após serem submetidos às técnicas histológicas de desparafinização e hidratação, os cortes em lâminas foram coradas pela Hematoxilina de Delafield (30 segundos), lavadas em água corrente durante cinco minutos, banhadas em água destilada, coradas em seguida pela Eosina por cinco minutos, desidratada em álcool absoluto I, II e III (cinco minutos cada), diafanizados em xilol para posterior montagem da lâmina com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2.3. Tricrômico de Gomori (Gomori, 1952)

Tricrômico de Gomori foi utilizado para diferenciação visual do tecido conjuntivo e fibras colágenas. As fibras colágenas se coram em verde, as fibras musculares estriadas esqueléticas em vermelho, epitélio em cinza violáceo; o citoplasma dos fibrócitos e fibroblastos em verde e o núcleo em azul.

Técnica de coloração: Após a hidratação dos cortes, estes foram corados levemente pela Hematoxilina Delafield, lavados em água corrente, coradas na sequência pelo Tricrômico de Gomori por 20 minutos, diferenciados em água destilada contendo ácido acético 0,2% por três segundos, lavados em água destilada, desidratados em álcool absoluto I, II e III (cinco minutos cada). Diafanizados em xilol I e II, montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.3. Técnicas Histoquímicas

A análise histoquímica consiste nas técnicas de ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 2,5 para identificar a produção de glicosaminoglicanas GAGs neutros e ácidos, respectivamente.

3.3.2. Ácido Periódico de Schiff – PAS (MCMANUS, 1946; LILLIE, 1947; HOTCHKISS, 1948)

A reação de PAS é utilizada para detecção GAGs neutros, portanto, tem-se como resultado, os GAGs neutros presente no citoplasma das células e as secreções coram-se de róseo a vermelho púrpura.

Técnica de coloração: Após a hidratação, os cortes foram oxidados por 10 minutos em solução de ácido periódico. Em seguida, banhados em água corrente por cinco minutos, imersos no reagente de Schiff por 10 minutos. Lavados em água corrente por cinco minutos, banhados em água destilada, corados pela Hematoxilina de Delafield por 15 segundos, lavados novamente em água destilada, desidratados em álcool absoluto I, II e III (cinco minutos cada), diafanizados em xilol e montagem com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.3.3. Alcian Blue pH 2.5 (STEEDMAN, 1950; LISON 1954; MOWRY, 1956; LEV E SPICER, 1964)

O Alcian Blue é uma técnica histoquímica utilizada para identificação de GAGs ácidos, portanto, tem-se como resultado, os GAGs ácidos presentes no citoplasma das células mucosas e nas secreções coram-se em azul escuro; núcleos e estruturas citoplasmáticas das células em róseo a róseo pálido.

Técnica de coloração: Após a hidratação, os cortes foram colocados em solução de ácido acético glacial a 3% por três minutos, corados em seguida pela solução de Alcian Blue pH 2.5 por 30 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, banhados rapidamente em água destilada, contracorados em solução de Nuclear Fast Red por cinco minutos, lavados em água corrente, desidratados em álcool absoluto I, II e III (cinco minutos cada), diafanizados em xilol I e II. As lâminas foram montadas utilizando Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.4. Observações e fotomicrografias

Fotomicrografias foram obtidas com câmera digital Nikon Coolpix 100, acoplada ao microscópio Nikon Elipse E100.

4 RESULTADOS

4.1 Esôfago

A parede do esôfago de embriões de 12 a 20 dias apresenta-se constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. A camada mucosa mostra-se revestida por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado e secretor. Os primórdios das glândulas esofágicas já estão presentes no 12º dia do desenvolvimento (estádio 37-38), a partir de brotamentos de células epiteliais que formam aglomerados no tecido conjuntivo, estas células proliferam-se e aprofundam-se no mesênquima. Inicialmente, os primórdios das glândulas esofágicas consistem em grupamentos celulares, semelhante às células que constituem o epitélio superficial neste mesmo estágio (Figura 01). A partir do 16º dia (estádio 42), observa-se luz no interior das glândulas esofágicas primordiais. As células que formam as glândulas se organizam em uma ou duas camadas ao redor do lúmen (Figura 02 e 03). Somente a partir do 19º e 20º dia (estádios 45), as células das glândulas apresentam-se altas localizadas na região basal, com características de glândulas mucosas (Figura 04). As células do epitélio da mucosa são positivas à produção de GAGs neutros (Figuras 5 a 8) e ácidos (Figuras 9 a 12) do 12º até 20º dia, ou seja, dos estádios 37 a 45, indicando que nessa fase o epitélio é secretor. As glândulas esofágicas primordiais são negativas às técnicas histoquímicas utilizadas no presente estudo até o 16º dia, ou seja, estágio 42 (Figuras 5, 9 e 10), mostrando-se fracamente positivas entre o 17º ao 19º dia, ou seja, estádios 43 a 45 ao PAS (Figuras 07 e 08) e ao AB (Figura 11). Mostram-se fortemente positivas no 20º dia, estágio 45 ao PAS (Figura 08) e ao AB (Figura 12), quando exibiu plena produção de GAGs neutras e ácidas (Tabela 01). As observações macro e microscópicas não evidenciaram o desenvolvimento do ingluvío ou papo durante os estádios 37 a 45.

4.2 Estômago

4.2.1 Proventrículo

Procedeu-se a análise histológica do estômago de embriões de 12 a 20 dias de incubação (estádios 37 a 45). O proventrículo aos 12 dias de desenvolvimento apresenta-se revestido internamente por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ou cilíndrico simples sobre tecido conjuntivo mesenquimal (Figura 13). Nesta fase, as glândulas proventriculares são formadas por epitélio pseudoestratificado cilíndrico (Figura 14). Em corte longitudinal, observa-se uma única camada de células revestindo a luz do ducto, futuro ducto excretor. As glândulas não demonstraram ramificações, sendo formadas por túbulos simples (Figura 15). Porém, a partir do 13º dia (estádio 39), iniciou-se o processo de ramificação das glândulas; a camada epitelial invaginou-se para o tecido conjuntivo mesenquimal originando o ducto excretor e ramificações das glândulas proventriculares (Figura 16). A partir do 14º dia (estádio 40), observam-se as células que constituem as glândulas com o formato cúbico e núcleo esférico, citoplasma acidófilo e granular. No 15º dia (estádio 41) nota-se que as ramificações das glândulas proventriculares são mais proeminentes.

Tabela 1. Resultados das reações histoquímicas no esôfago de *G. gallus*

Dias de desenvolvimento	PAS		AB 2.5	
	Epitélio Superficial	Glândula	Epitélio Superficial	Glândula
12	+++	-	+++	-
13	+++	-	+++	-
14	+++	-	+++	-
15	++	-	++	-
16	++	-	++	-
17	+	+	++	+
18	+	++	+	++
19	+	++	+	++
20	+	+++	+	+++

(+++) Reação fortemente positiva; (++) moderadamente positiva; (+) fracamente positiva; (-) reação negativa; (~) estrutura ainda não formada.

Por volta do 15º dia do desenvolvimento (estádio 41), o epitélio da camada mucosa diferencia-se em cilíndrico simples mucossecretor e os sulcos tornam-se cada vez mais profundos (Figura 17). A partir do 17º dia de desenvolvimento (estádio 42), o proventrículo já exibe morfologia semelhante à do animal adulto, porém a muscular da mucosa mostrou-se muito pouco evidente em todos os estádios do desenvolvimento (37 a 40), ou seja, do 12º ao 20º dia, confirmado pelo tricrômico de Gomori (Figura 18). Portanto, as glândulas proventriculares foram encontradas no tecido conjuntivo da lâmina própria/submucosa.

As estruturas proventriculares são positivas para as técnicas histoquímicas de PAS e AB pH 2,5 em todos os estádios de desenvolvimento (Figuras 19 a 25), sendo que o epitélio superficial mostrou-se fortemente positivo, principalmente nos estádios mais avançado, enquanto células de revestimento dos sulcos e ductos foram fracamente positivas à produção de ambos os tipos de GAGs neutras e ácidas em todos os estádios de 12 a 20 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados das reações histoquímicas no proventrículo de *G. gallus*

Dias de desenvolvimento	PAS			AB 2.5		
	Epitélio Superficial	Glândula		Epitélio Superficial	Glândula	
		Sulcos	Ducto central		Sulcos	Ducto central
12	++	+	+	++	+	+
13	++	+	+	++	+	+
14	++	+	+	++	+	+
15	++	+	+	++	+	+
16	+++	+	+	+++	+	+
17	+++	+	+	+++	+	+
18	+++	+	+	+++	+	+
19	+++	+	+	+++	+	+
20	+++	+	+	+++	+	+

(+++) Reação fortemente positiva; (++) moderadamente positiva; (+) fracamente positiva; (-) reação negativa; (~) estrutura ainda não formada.

4.2.2 Moela

A moela apresenta-se constituída por três camadas: mucosa, muscular e serosa. Nos embriões de 12 a 14 dias de desenvolvimento (estádios 37 a 40), a camada mucosa mostra-se recoberta por epitélio pseudoestratificado cilíndrico (Figura 26). Nesta fase não havia vestígio de glândula (Figuras 26 e 27). A partir do 13º dia (estádio 39) o epitélio superficial começa a demonstrar irregularidades na borda apical. Após o 14º dia (estádio 40), a camada de células epiteliais apresenta-se mais alta, como se houvesse proliferação celular e invasão destas no tecido conjuntivo (Figura 27). A diferenciação do epitélio inicia pelo terço final da moela, porção próxima à transição com o intestino delgado. A partir do 15º (estádio 41), o epitélio da camada mucosa se diferencia e gradualmente adquire a forma de epitélio simples, as células tornam-se cúbicas com núcleo esférico e citoplasma acidófilo. Após 16º dia de incubação, as células apresentam ligeira falta de coesão e em fase de reorganização, provavelmente para formar as glândulas tubulares. Surgem espaços intercelulares, ou lacunas entre as células (Figura 28), separando-as pela membrana lateral. Esses espaços intercelulares são preenchidos com secreção de natureza acidófila. A partir do 17º dia, as glândulas tubulares foram consideradas como já formadas, pois estas apresentaram características morfológicas bem definidas (Figuras 29 e 30).

A mucosa da moela mostrou-se positiva às técnicas de PAS e AB (Figura 31 a 37), os resultados histoquímicos estão descritos na Tabela 3. Nos embriões de 12 dias (estádio 37/38), a mucosa mostra-se positiva à técnica de PAS (Figura 31) e apenas a região apical da mucosa reagiu ao AB (Figura 34), enquanto nos embriões de 13 a 16 dias (estádio 39 a 42) todas as porções da mucosa mostram-se positivas ao PAS (Figuras 32 e 33) e ao AB (Figura 35). Nos estádios finais (43 a 45), por volta de 17 a 20 dias de incubação, todas as regiões das glândulas tubulares mostra-se positivas às técnicas histoquímicas (Figuras 36 e 37). Não há formação de placa de secreção até o 20º dia do desenvolvimento (estádio 45).

Tabela 3. Resultado das reações histoquímicas na moela de *G. gallus*

Dias de desenvolvimento	PAS		AB 2.5	
	Epitélio Superficial	Glândula	Epitélio Superficial	Glândula
12	++	~	+	~
13	++	~	+	~
14	++	~	+	~
15	+++	~	+	~
16	+++	~	+	~
17	+++	++	++	++
18	+++	++	++	++
19	+++	++	++	++
20	+++	++	++	++

(+++) Reação fortemente positiva; (++) moderadamente positiva; (+) fracamente positiva; (-) reação negativa; (~) estrutura ainda não formada.

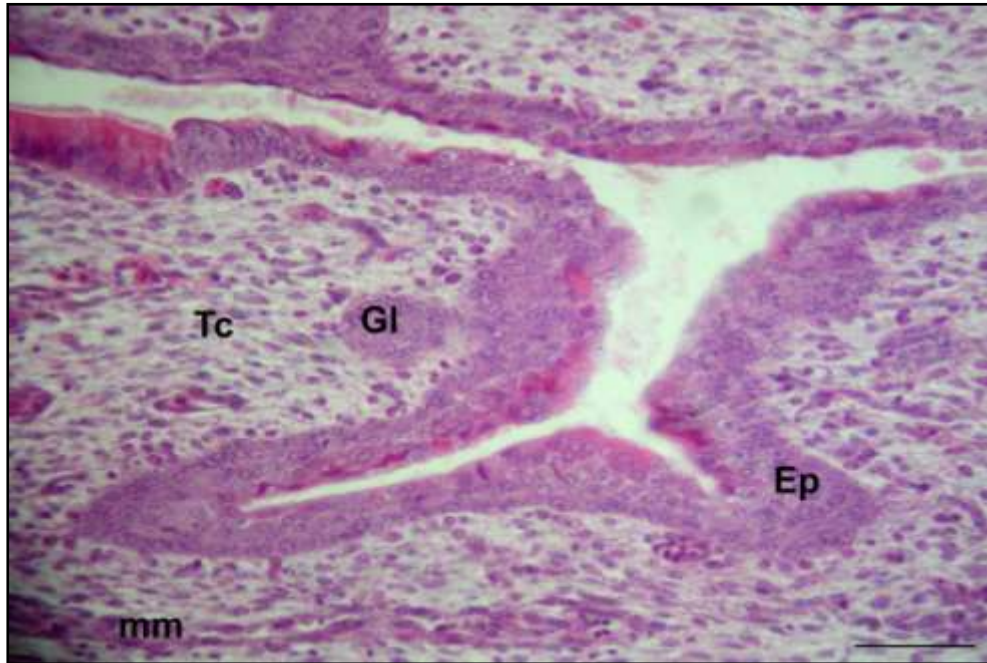


Figura 1. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo, mm: muscular da mucosa Barra: 100 μ m.

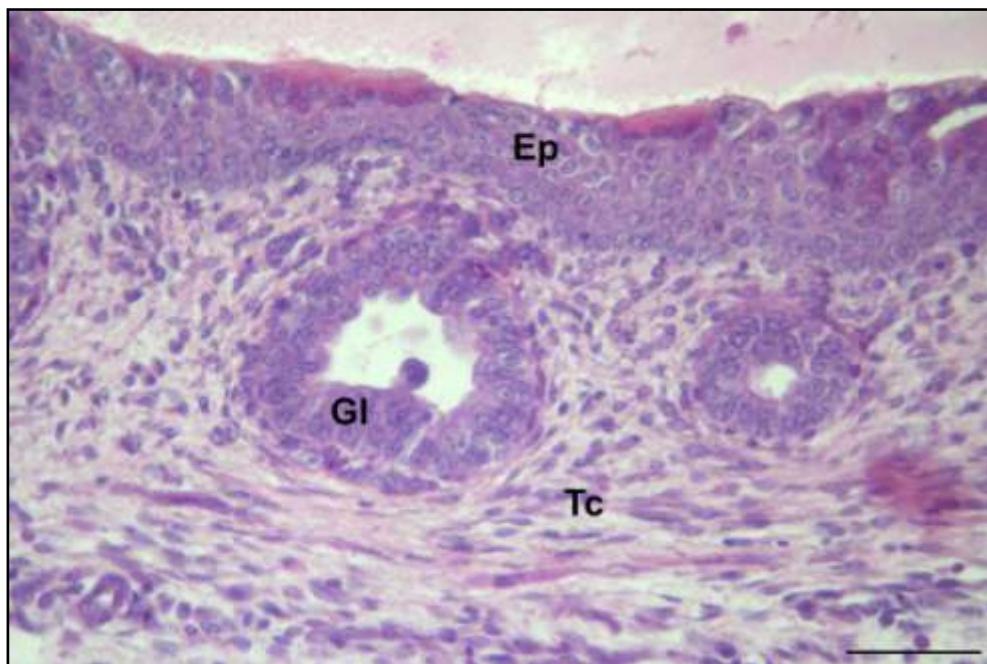


Figura 2. Fotomicrografia esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordial, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

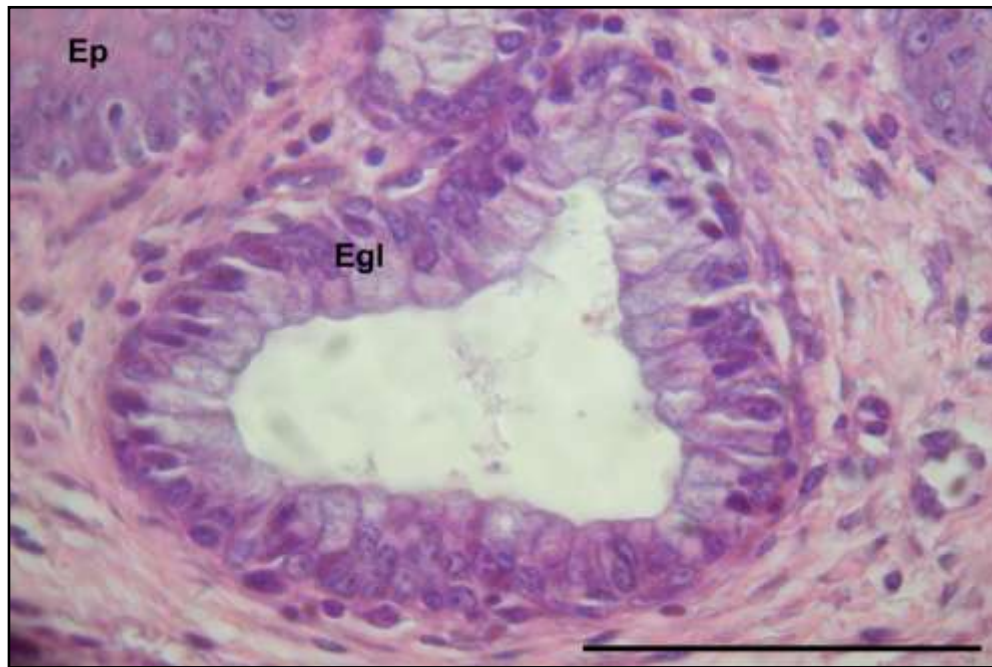


Figura 3. Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 44 (18 dias). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Egl: Glândula esofágica. Barra: 50µm.



Figura 4. Fotomicrografia das glândulas esofágicas em formação no estágio 45 (20 dias). Coloração: HE. Ep: Epitélio, Egl: Glândula esofágica, ct: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.

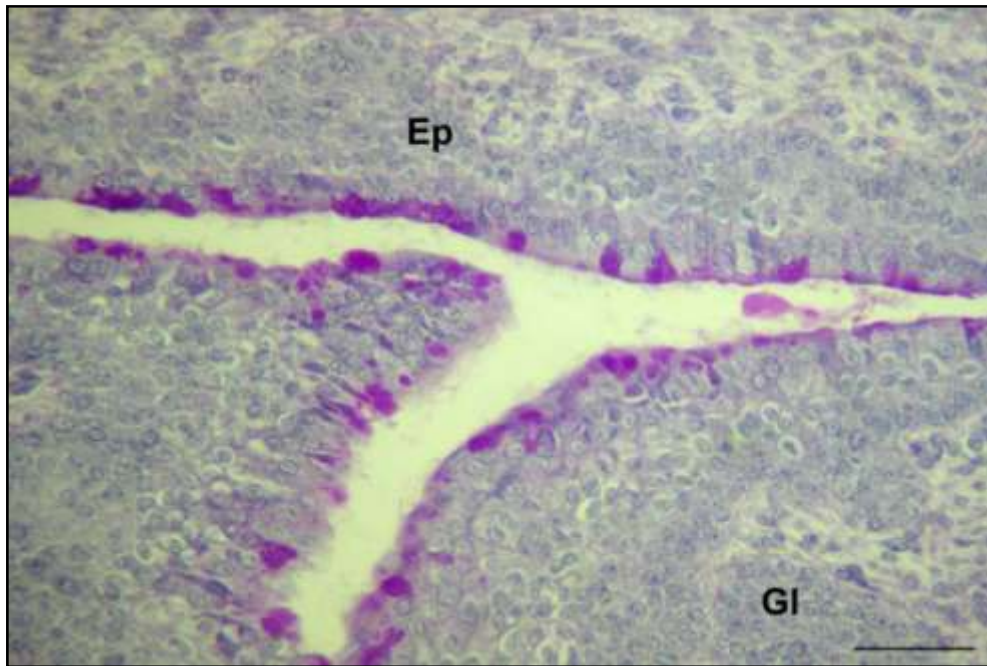


Figura 5. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Células da mucosa positivas ao PAS. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordia, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

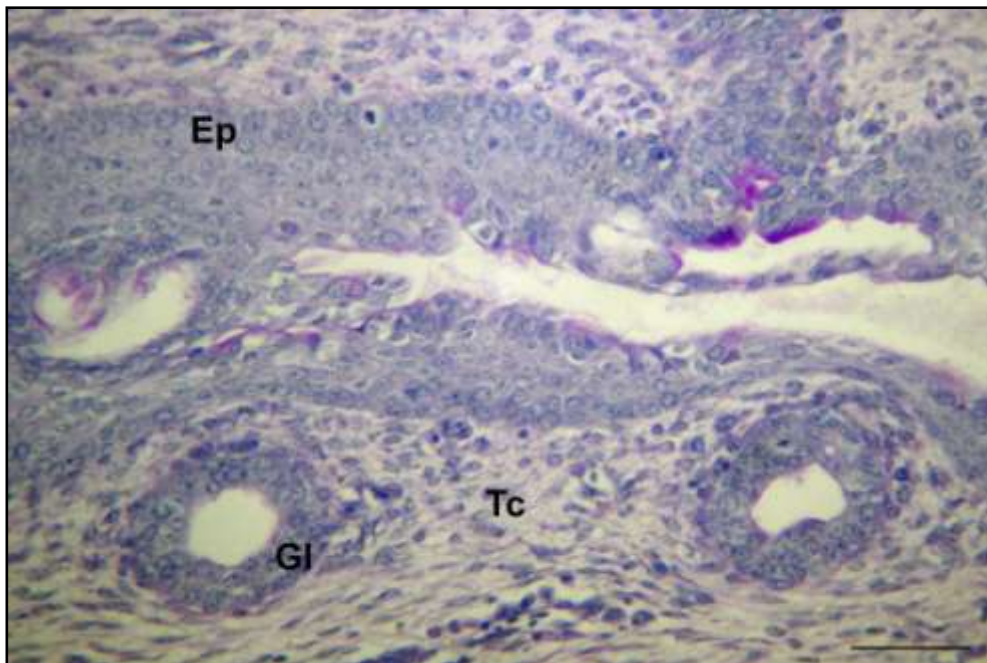


Figura 6. Esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Células do epitélio de revestimento da mucosa e poucas células das glândulas esofágicas positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula primordia, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

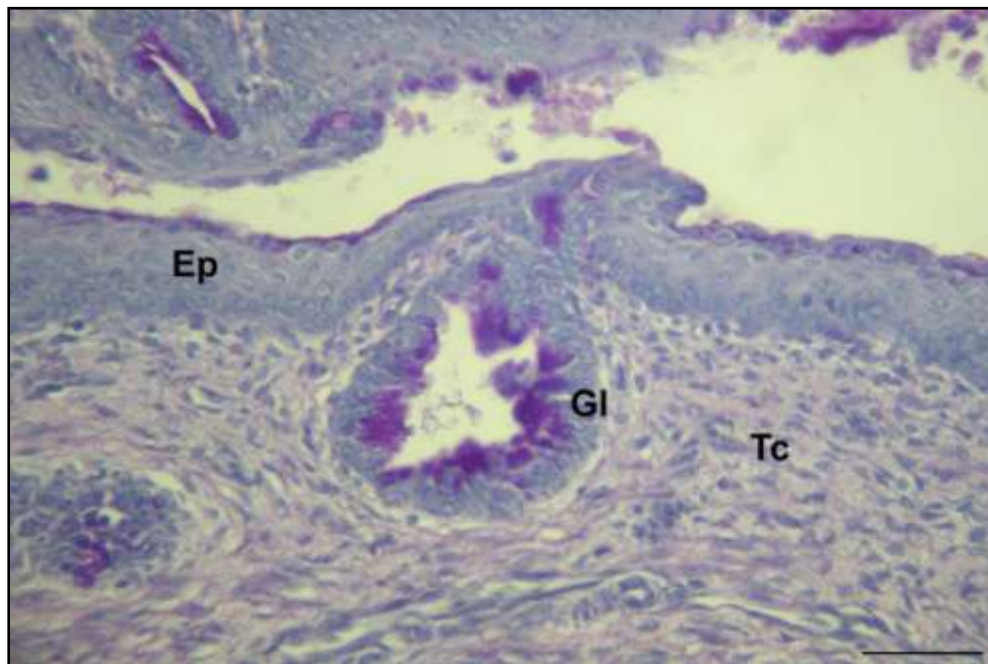


Figura 7. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 18 dias (estágio 44). Glândula esofágica em fase final da diferenciação, positiva ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

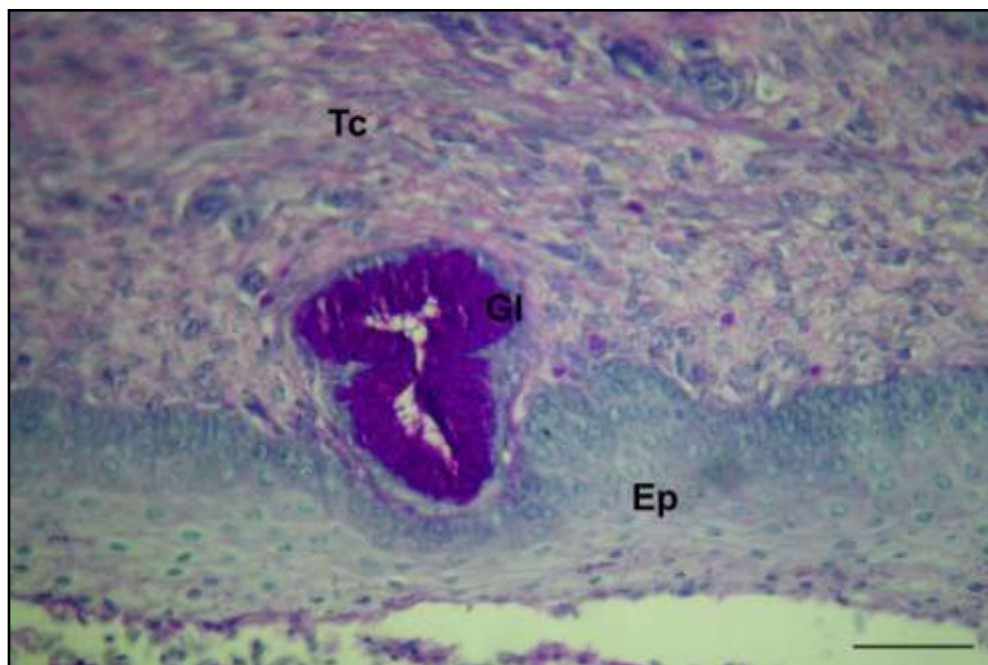


Figura 8. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 20 dias (estágio 45). Glândula esofágica positiva ao PAS. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

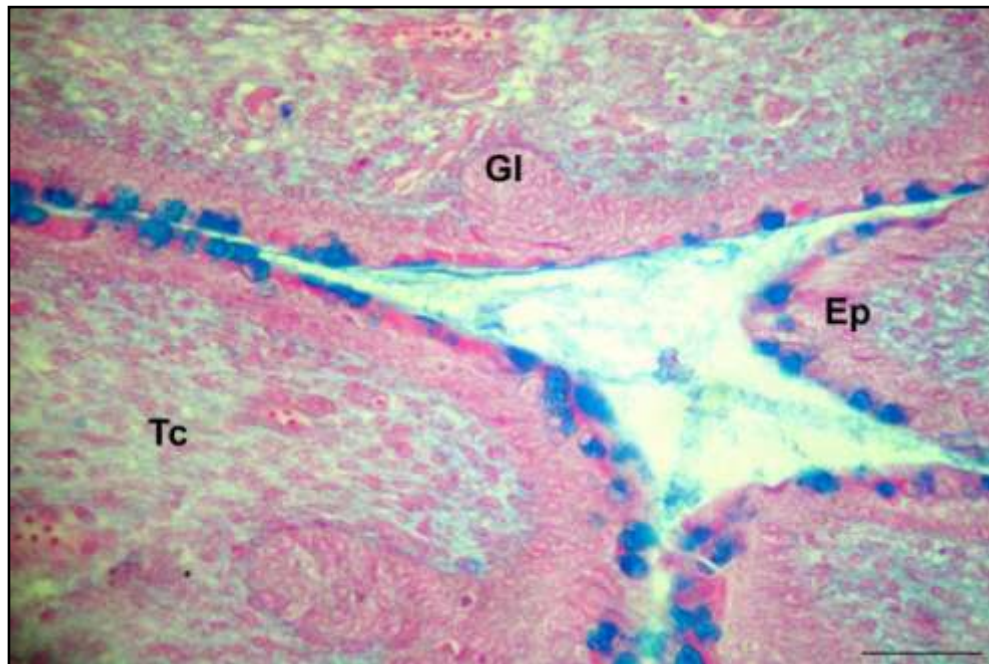


Figura 9. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 14 dias (estágio 40). Células superficiais da mucosa positiva ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100µm.

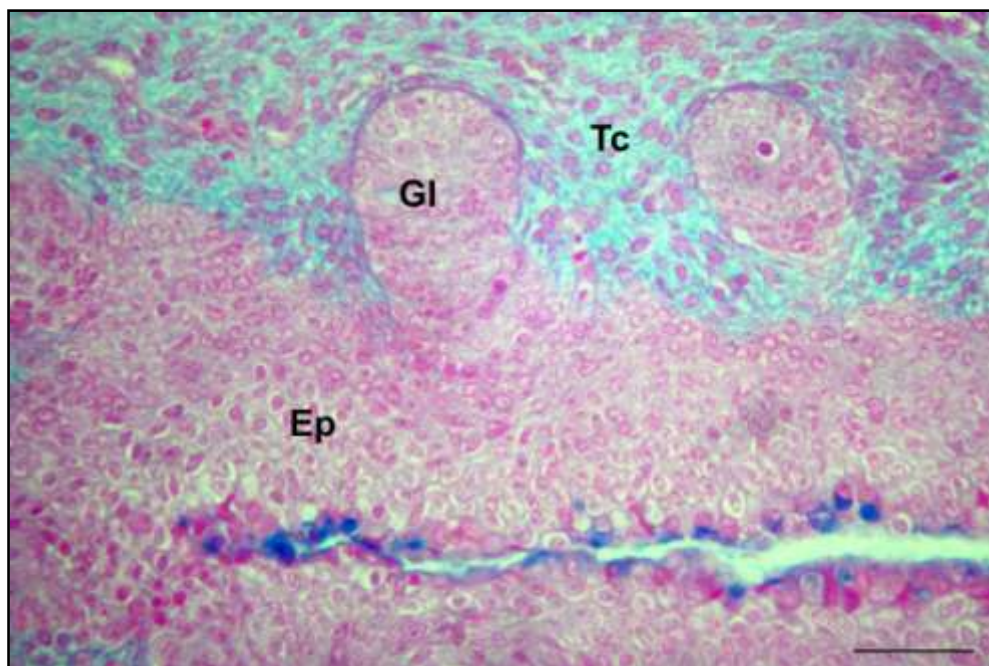


Figura 10. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 15 dias (estágio 41). Células superficiais da mucosa positivas ao AB e glândulas esofágicas negativas. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100µm.

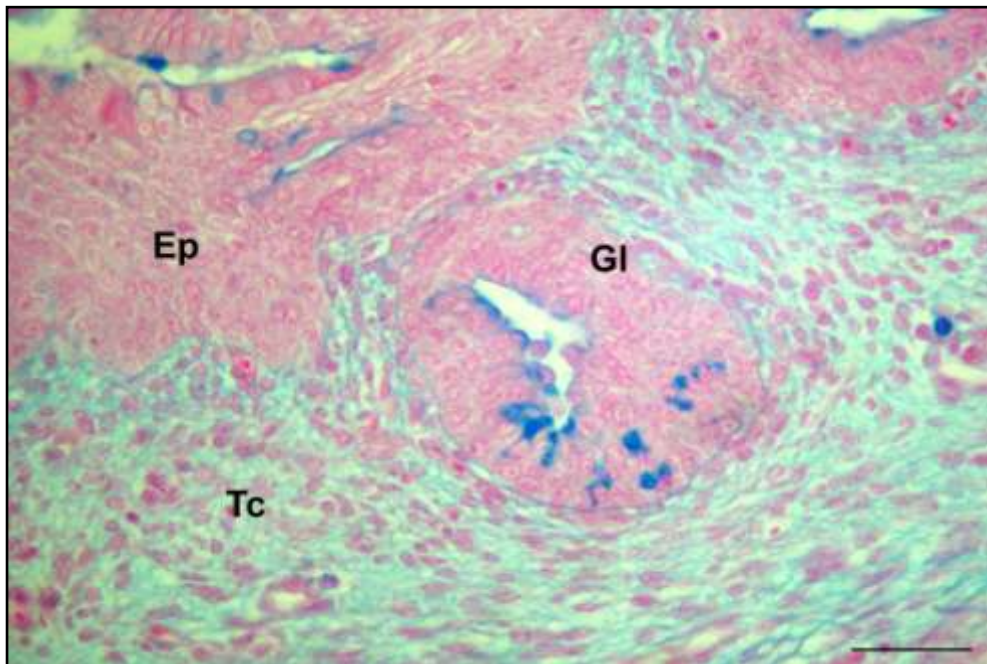


Figura 11. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 17 dias (estágio 43). Células da mucosa e da glândula primordial positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

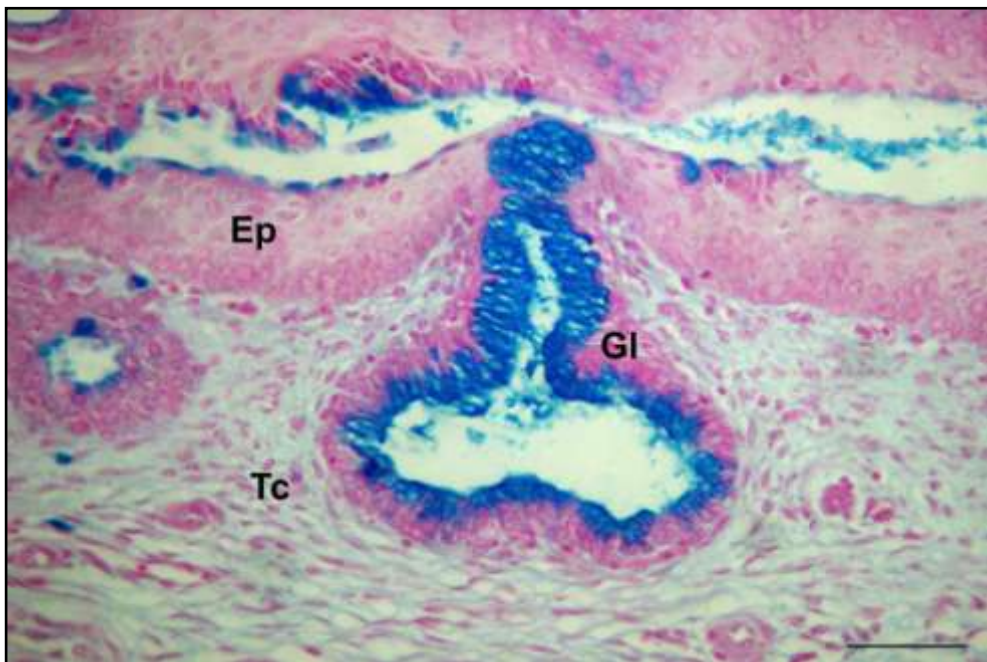


Figura 12. Fotomicrografia do esôfago do embrião de 20 dias (estágio 45). Células da mucosa e das glândulas esofágicas positivas ao AB. Ep: Epitélio, Gl: Glândula, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 100 μ m.

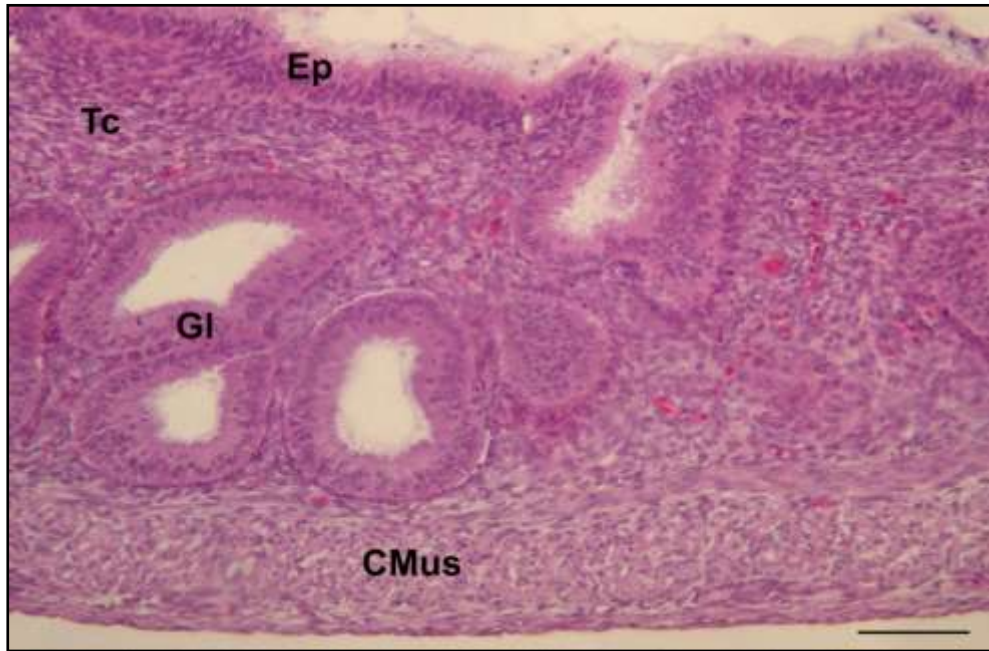


Figura 13. Fotomicrografia do embrião com 12 dias de incubação (estádio 37 e 38). Mucosa e glândulas proventriculares revestidas por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular. Barra: 100 μ m.

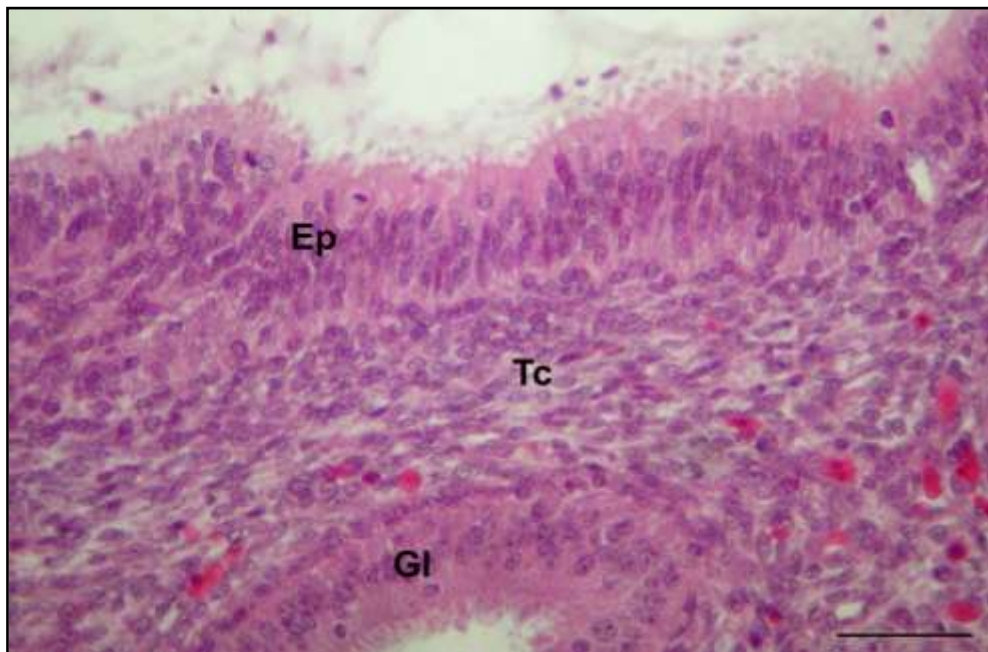


Figura 14. Fotomicrografia de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37-38). Mucosa e glândula proventricular primordial revestidas por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50 μ m.

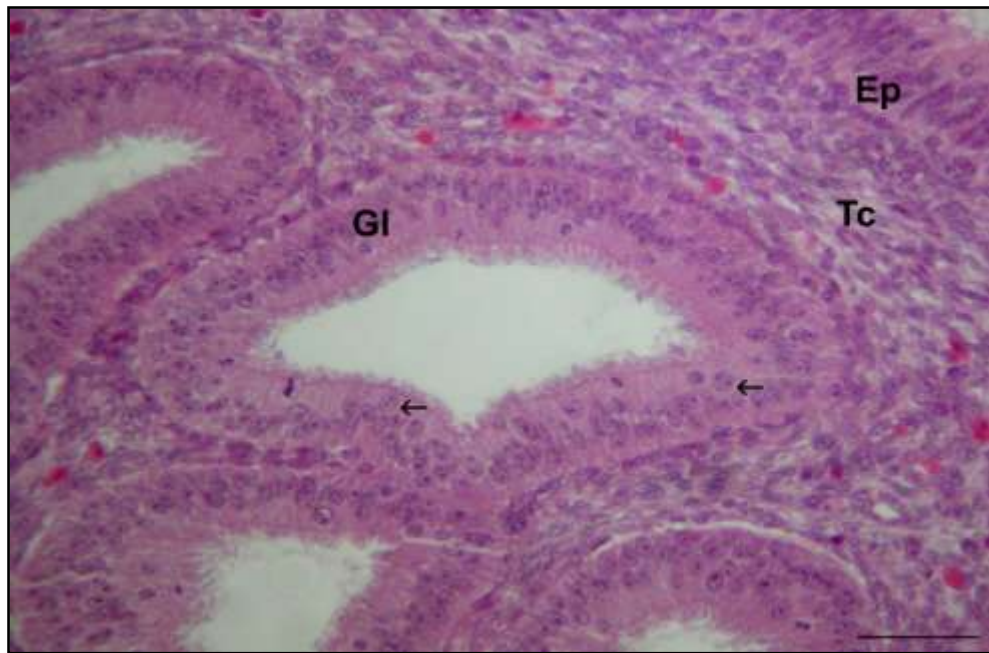


Figura 15. Fotomicrografia de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37-38). Glândulas proventriculares primordiais do tipo simples e tubular. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Setas: Células binucleadas. Barra: 50µm.

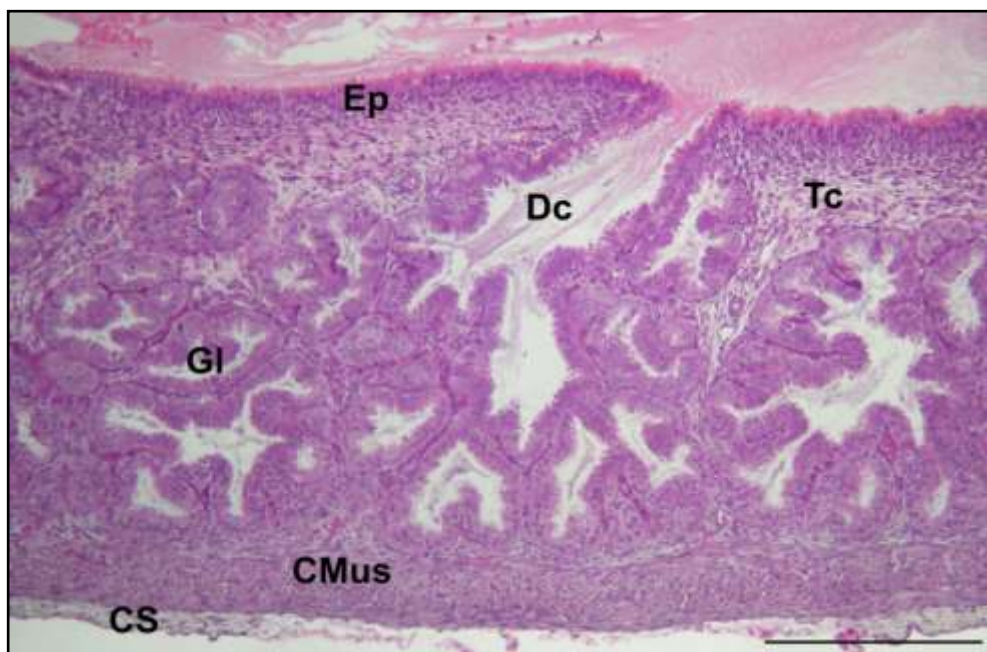


Figura 16. Fotomicrografias de embrião de 13 dias (estádio 39). As glândulas proventriculares ramificadas, revestidas por epitélio simples cúbico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc: Ducto excretor, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50µm.

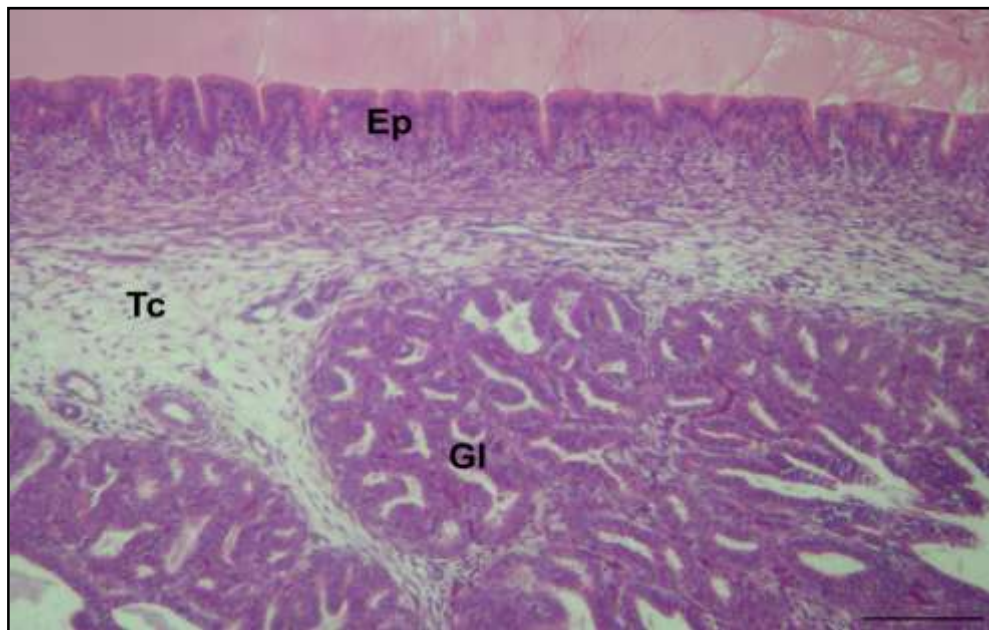


Figura 17. Fotomicrografia de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa revestida por epitélio simples cilíndrico mucossecretor. Glândulas proventriculares bem ramificadas. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50µm.

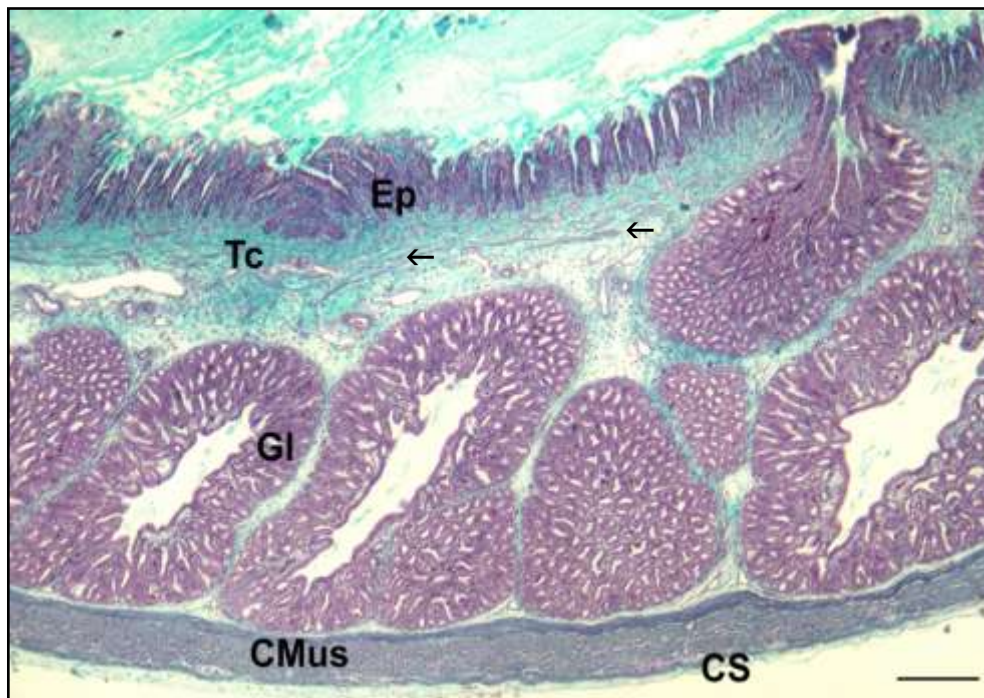


Figura 18. Fotomicrografia de embrião de 19 dias (estádio 45). Muscular da mucosa pouco evidente. Glândulas proventriculares presente na camada mucosa /submucosa. Coloração: Tricrômico de Gomori. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc: Ducto excretor, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa, Setas: muscular da mucosa. Barra: 100µm.

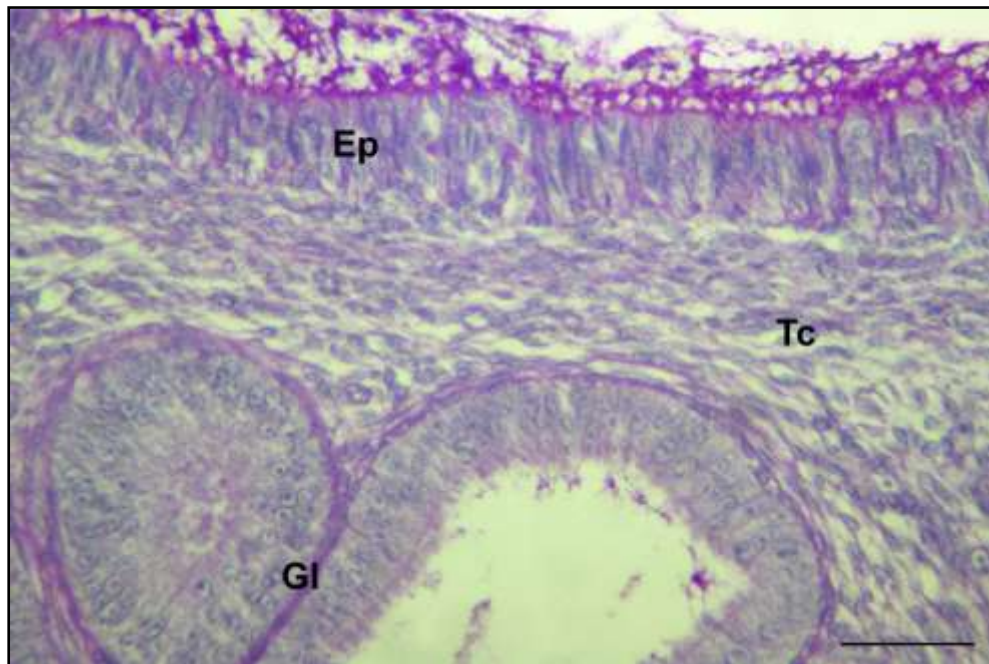


Figura 19. Fotomicrografia de embrião de 12 dias (estádio 37 e 38). Mucosa proventricular positiva ao PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 50 μ m.

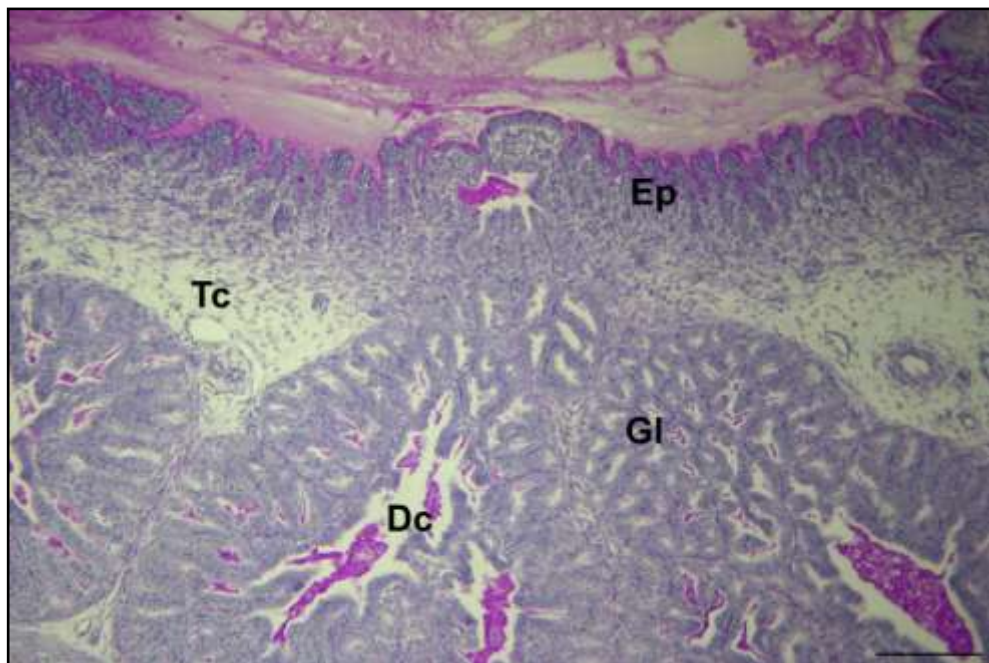


Figura 20. Fotomicrografia do proventriculo de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa positiva à técnica de PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, Dc: Ducto excretor central. Barra: 100 μ m.

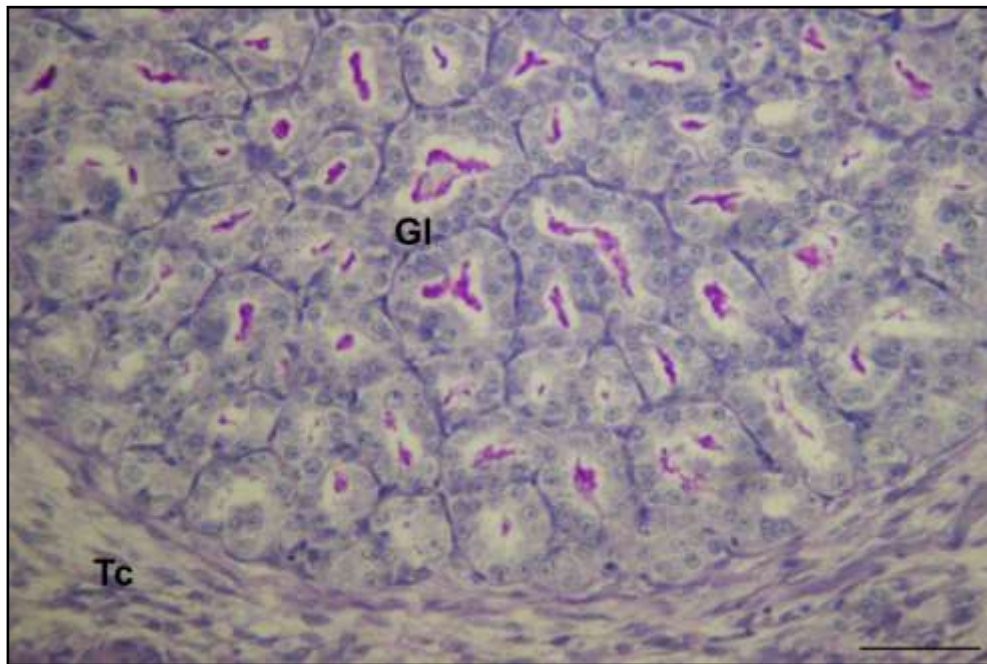


Figura 21. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 17 dias (estádio 43). Secreção das glândulas proventriculares fracamente positivas à técnica de PAS. Tc: Tecido conjuntivo, GI: Glândula proventricular. Barra: 50µm.

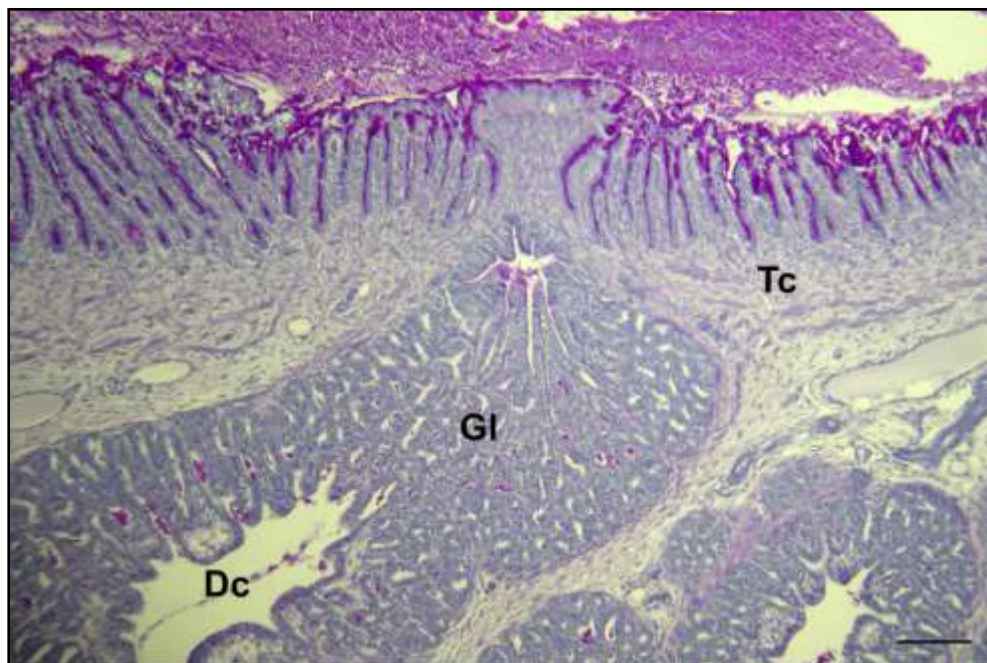


Figura 22. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 19 dias de incubação (estádio 45). Mucosa positiva à produção de GAGs neutras, principalmente pelo epitélio secretor (PAS). Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, GI: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50µm.

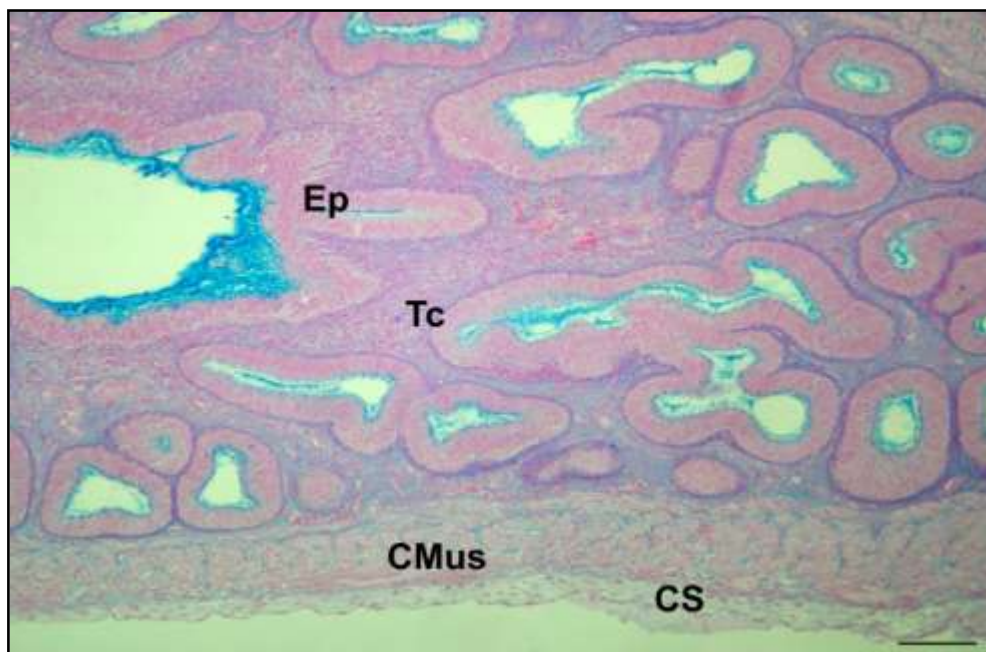


Figura 23. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 12 dias de incubação (estádio 37 - 38). Mucosa do proventrículo positiva à produção de GAGs neutras, principalmente pelo epitélio superficial. Técnica: PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 50 μ m.

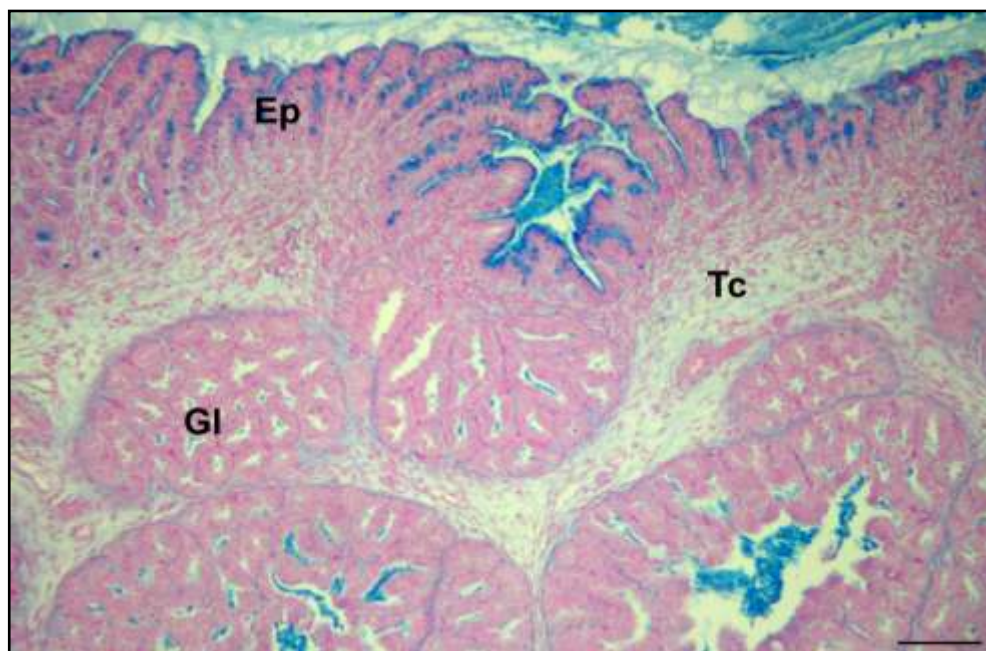


Figura 24. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa positiva à técnica de AB. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular, CMus: Camada muscular, CS: Camada Serosa. Barra: 100 μ m.

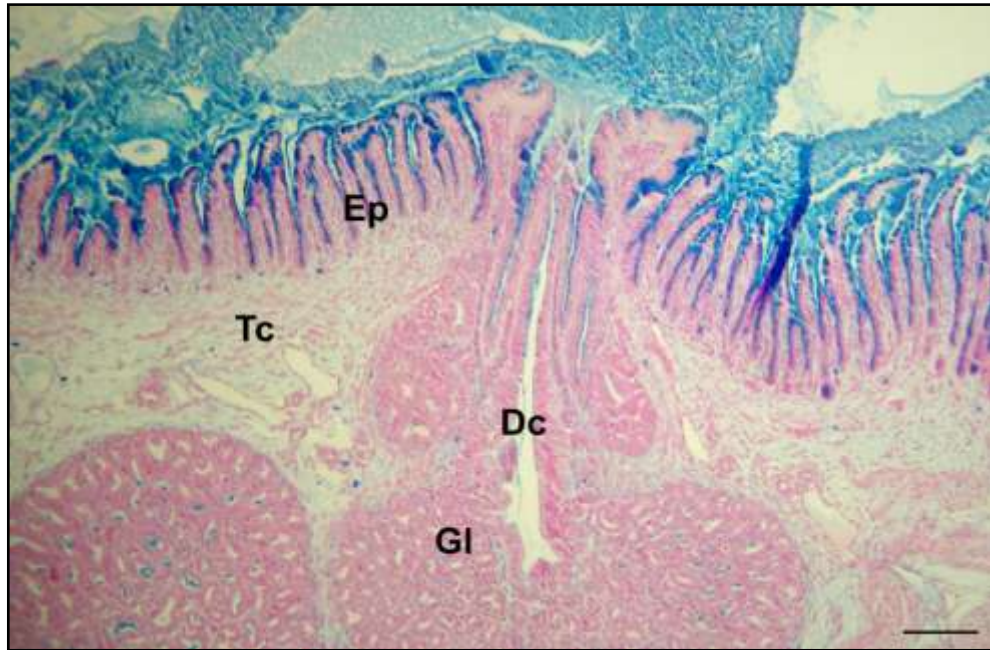


Figura 25. Fotomicrografia do proventrículo de embrião de 19 dias (estádio 45). Mucosa positiva à técnica de AB pH 2,5. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Gl: Glândula proventricular. Barra: 100 μ m.

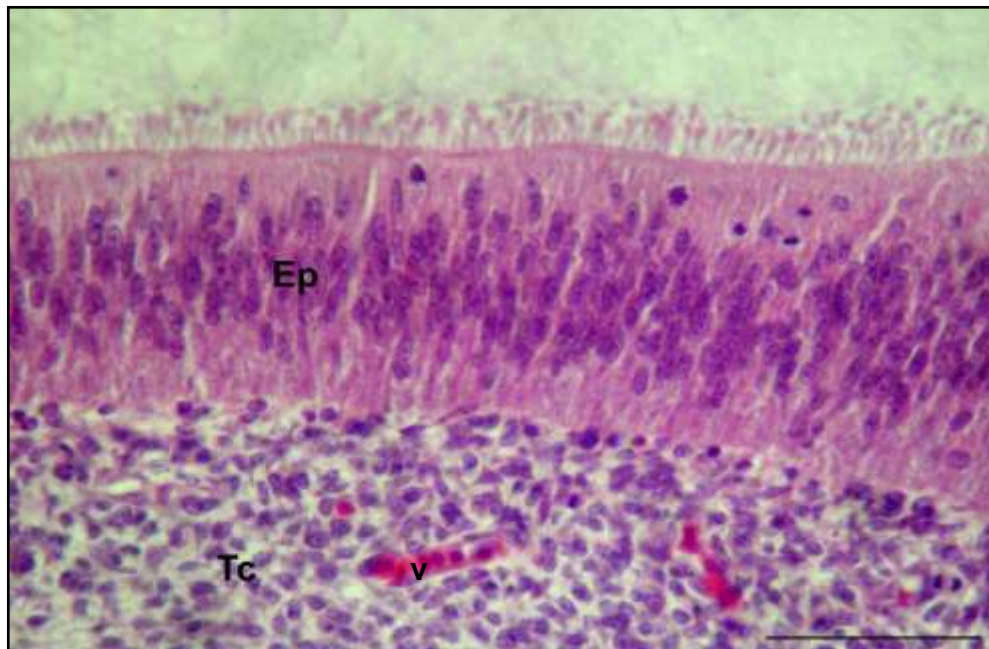


Figura 26. Fotomicrografia da moela de embrião de 12 dias (estádio 37 - 38). Mucosa revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, V: vaso sanguíneo. Barra: 50 μ m.

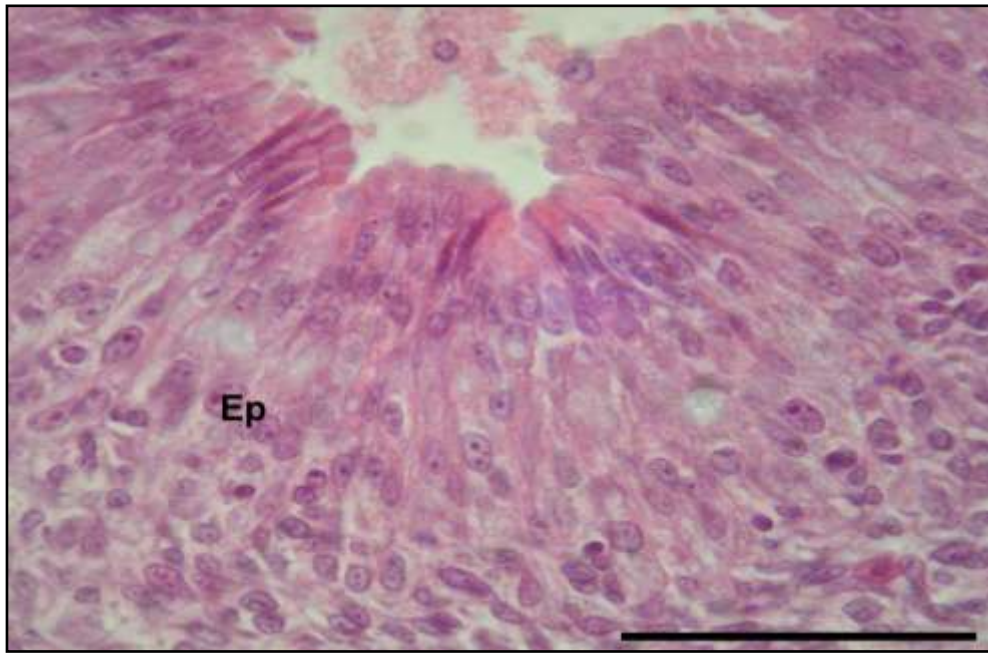


Figura 27. Fotomicrografia da moela de embrião de 14 dias (estádio 40). Camada mucosa da moela revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Coloração: HE. Ep: Epitélio. Barra: 100 μ m.

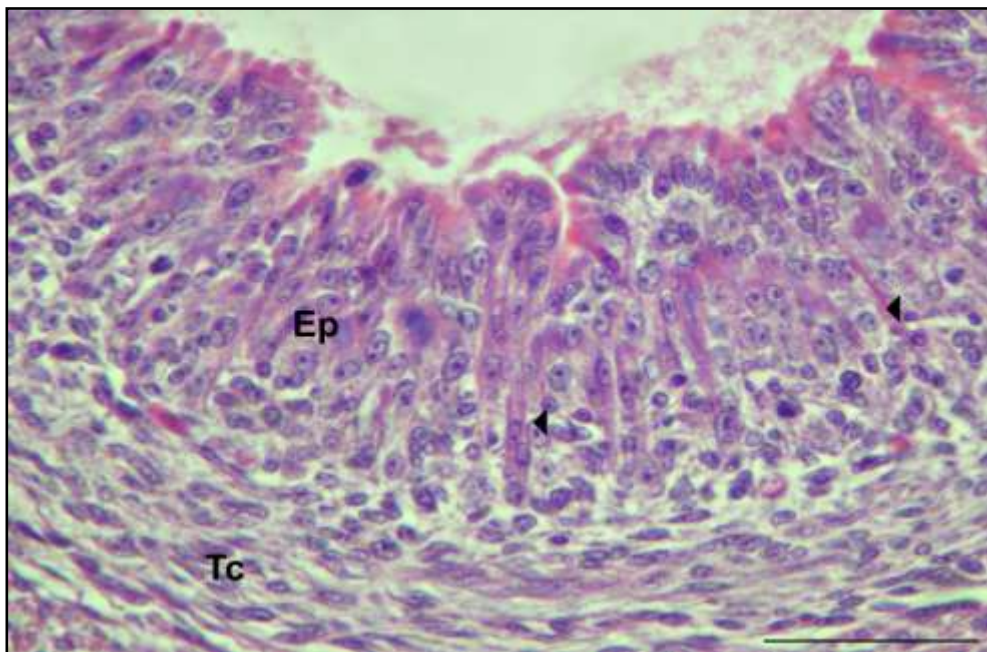


Figura 28. Fotomicrografia da moela de embrião de 16 dias (estádio 42). Mucosa em fase de reorganização para formar as glândulas tubulares. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, Cabeça de setas: Espaços intercelulares ou lacunas. Barra: 100 μ m.

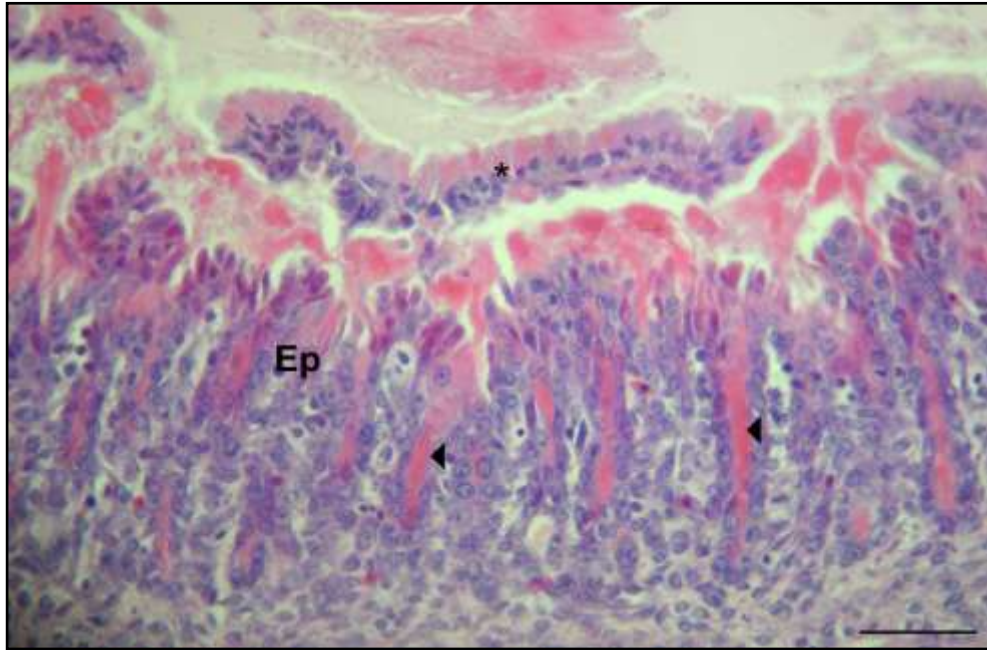


Figura 29. Fotomicrografia da moela de embrião com 17 dias de desenvolvimento (estádio 43). Camada mucosa com glândulas tubulares já formada. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Cabeça de setas: Ductos das glândulas retas. Barra: 50um.

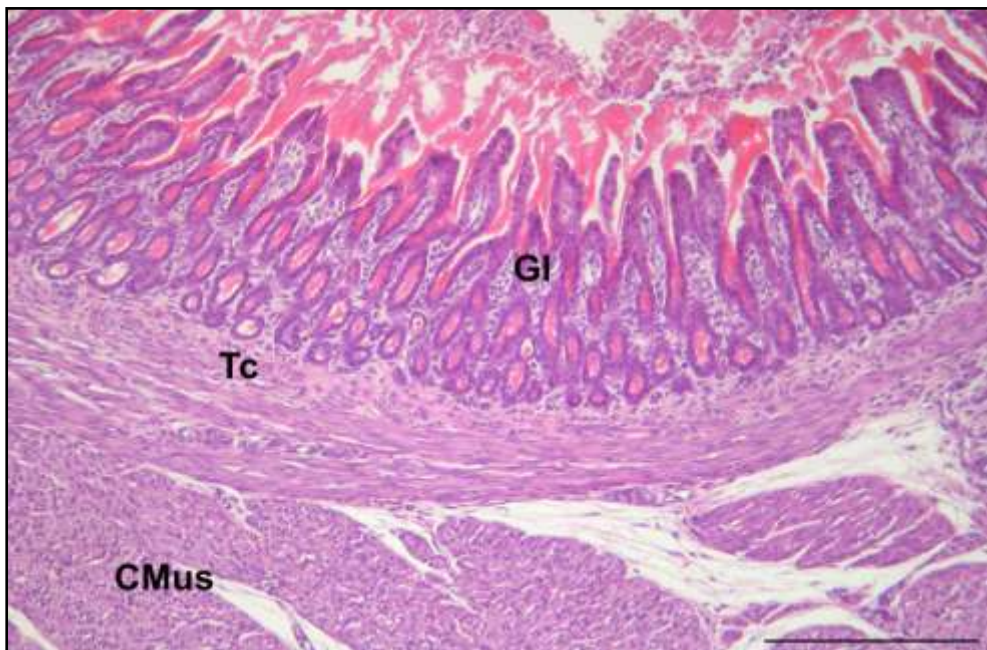


Figura 30. Fotomicrografia da moela de embrião com 20 dias de incubação (estádio 45). Camada mucosa com glândulas tubulares bem formadas. Coloração: HE. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo, CMus: Camada Muscular. Barra: 50µm.

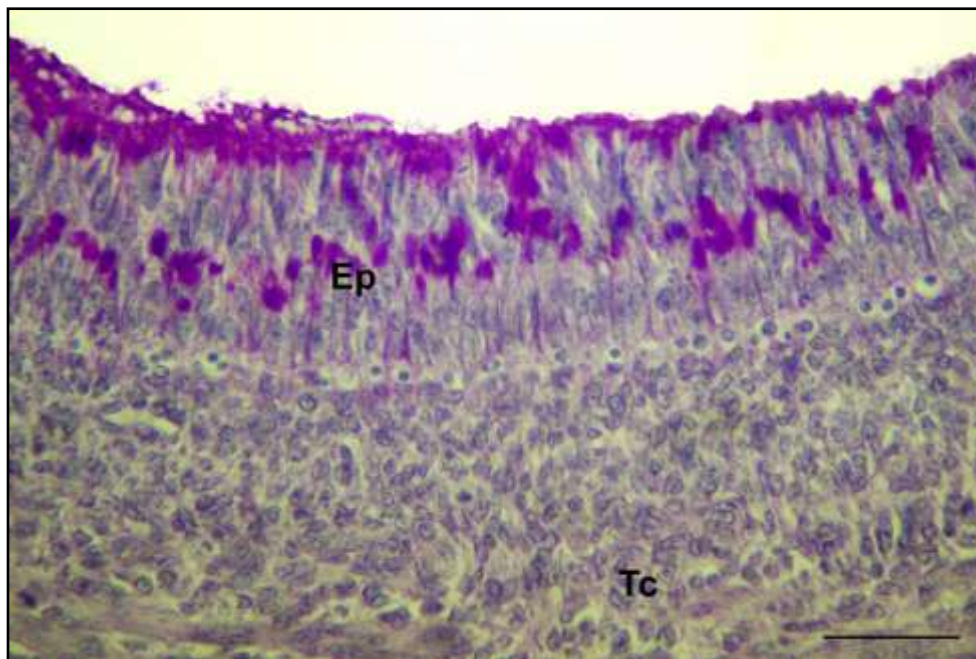


Figura 31. Fotomicrografia da moela de embrião com 12 dias de incubação (estádio 37/38). Mucosa positiva à produção de GAGs neutras. Técnica: PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.



Figura 32. Fotomicrografia da moela de embrião de 16 dias (estádio 42). Glândulas tubulares primordiais positivas à técnica de PAS. Gl: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

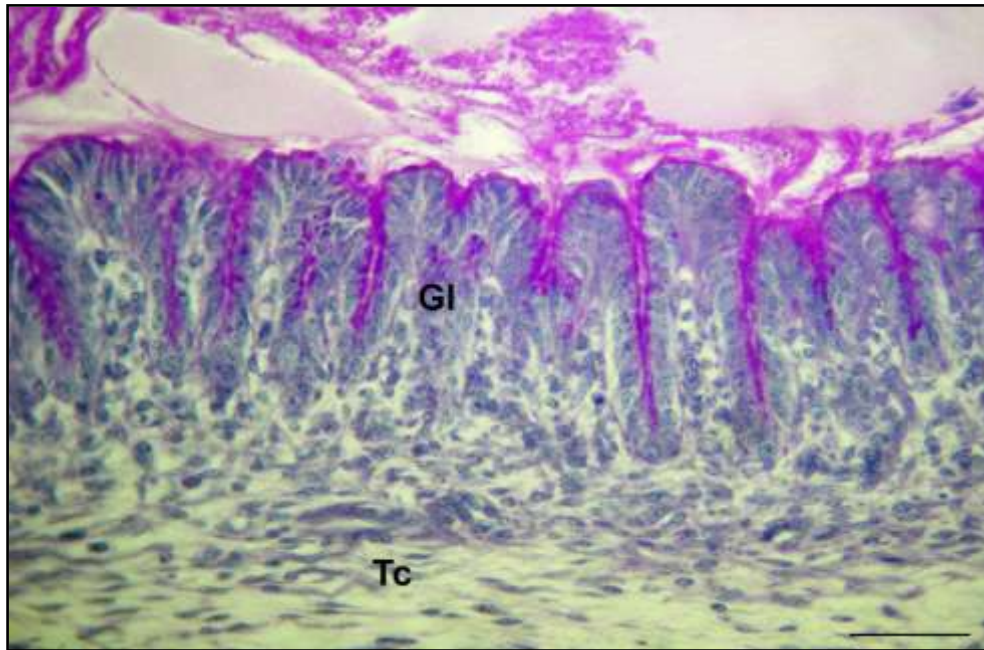


Figura 33. Fotomicrografia da moela de embrião com 17 dias de incubação (estádio 43). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de PAS. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.

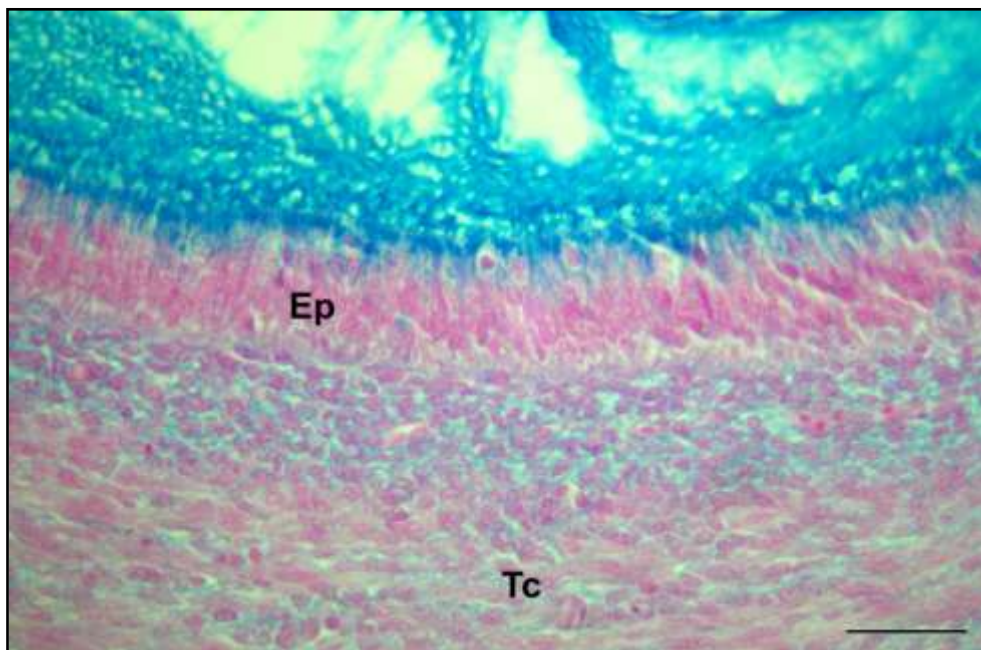


Figura 34. Fotomicrografia da moela embrião de 12 dias (estádio 37/38). Mucosa positiva à técnica de AB na superfície apical. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50µm.

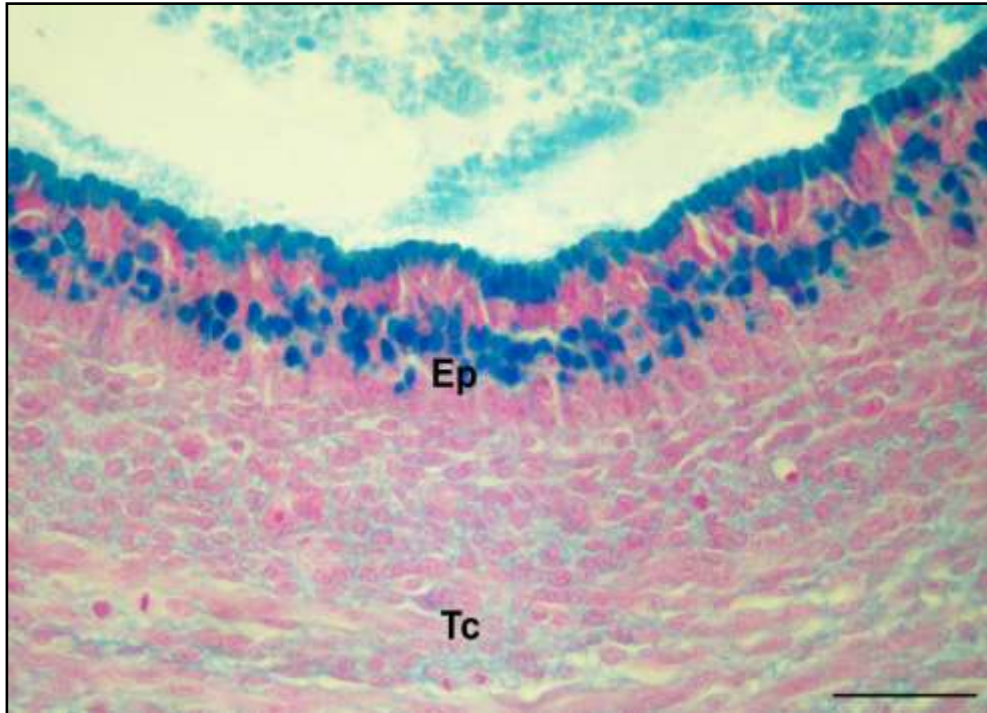


Figura 35. Fotomicrografia da moela de embrião de 13 dias (estádio 39). Mucosa positiva à técnica de AB. Ep: Epitélio, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

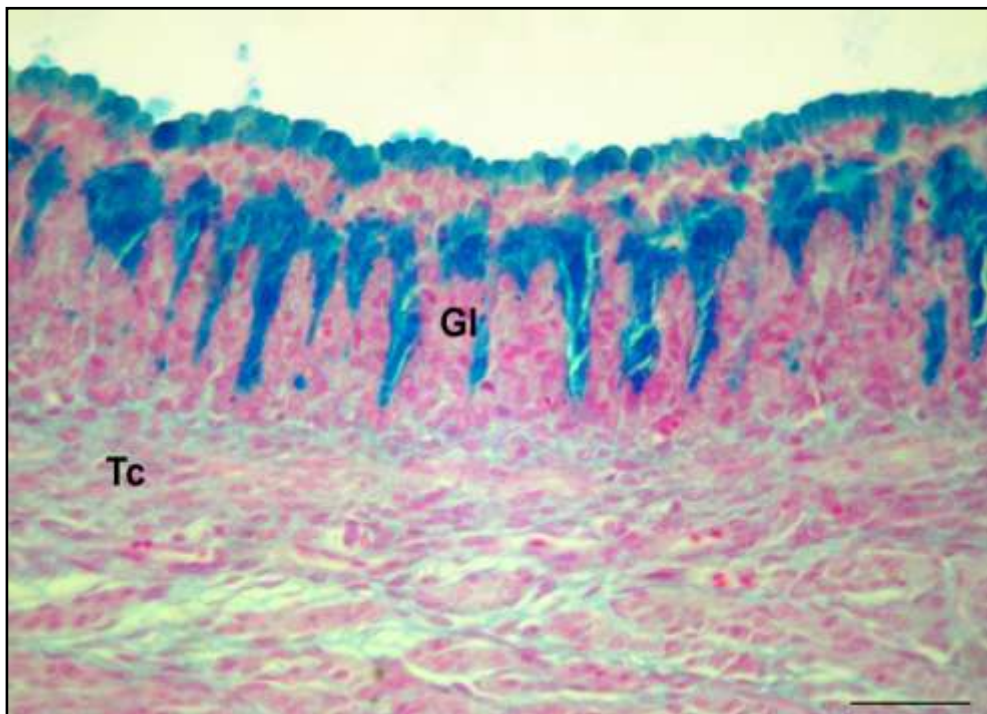


Figura 36. Fotomicrografia da Meola de embrião com 17 dias de incubação (estádio 43). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de AB. Gl: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo. Barra: 50 μ m.

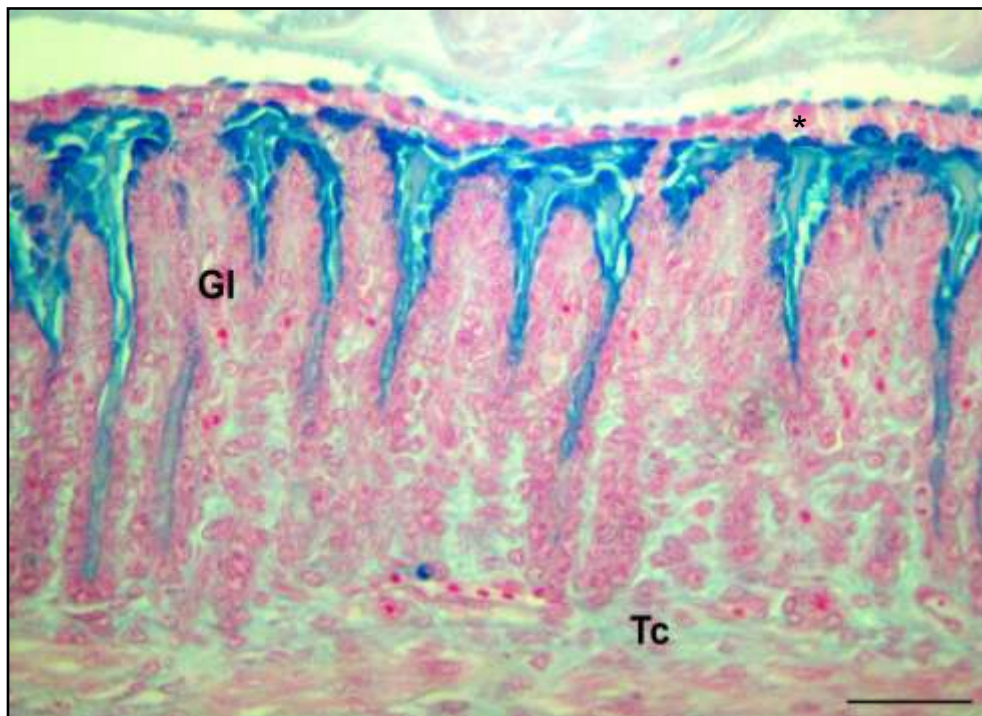


Figura 37. Fotomicrografia da moela de embrião com 19 dias de incubação (estádio 45). Mucosa e glândulas tubulares positivas à técnica de AB. GI: Glândulas tubulares, Tc: Tecido conjuntivo, (*): Células epiteliais se soltando. Barra: 50 μ m.

5. DISCUSSÃO

O trato gastroesofágico é revestido por uma mucosa que difere em cada segmento, de acordo com a estrutura e função. A mucosa gastroesofágica possui glândulas e células secretoras de GAGs, o muco secretado por essas células e glândulas forma uma camada protetora (DÍAZ *et al.*, 2003; PIEL *et al.*, 2005; KIERSZENBAUM, 2008). As células produtoras de GAGs neutras são reativas ao PAS, enquanto as ácidas se coram pelo AB. As GAGs podem ser classificados histoquimicamente como neutros ou ácidos (FORDER *et al.*, 2007). No tubo digestivo, as GAGs neutras formam um muco pouco viscoso que favorece o trânsito digestivo ao lubrificar as partículas alimentares, permitindo que estas sejam impulsionadas para o próximo segmento. As GAGs ácidas apresentam alta viscosidade, sendo fundamentais no aprisionamento de partículas e na formação da barreira de proteção contra atritos mecânicos e ação do ácido digestivo (SIBBING & URIBE, 1985). A composição e a dinâmica da secreção diferem de acordo com a necessidade e a função dos tecidos epiteliais em resposta às condições ambientais (DÍAZ *et al.*, 2003; KIERSZENBAUM, 2008; THORNTON *et al.*, 2008).

No início do desenvolvimento, a camada mucosa do esôfago apresenta células epiteliais secretoras na superfície apical tanto de GAGs neutras e ácidas. Porém a atividade secretória destas células decresce com o desenvolvimento, provavelmente para compensar a ausência das glândulas mucosas e pouca produção de GAGs durante sua formação destas. No entanto, no 20º dia do desenvolvimento, ao contrário do epitélio superficial, as glândulas esofágicas demonstraram plena produção de GAGs ácidas e neutras, indicando que nesta fase final do desenvolvimento as glândulas já estão completamente formadas e totalmente funcionais. Este achado assemelha-se ao que foi observado em aves adultas de várias espécies (RAJABI & NABIPOUR, 2009).

O desenvolvimento do proventrículo foi acompanhado a partir do 12º dia e os achados histológicos estão de acordo com Toner (1965), Takiguchi *et al.* (1988), Sgambati *et al.* (1996), Aksoy & Cinar (2009). De acordo com Takiguchi *et al.* (1988) e Aksoy & Cinar (2009) o proventrículo ao 9º dia de desenvolvimento embrionário é revestido por epitélio pseudoestratificado cilíndrico que persiste até o 14º dia, Sgambati *et al.* (1996) observaram o primórdio da glândula proventricular por volta do 7º dia, descrevendo-a com pequenas projeções dentro do mesênquima, mas que, a partir do 8º dia, mostrou-se alongada e com formato tubular. Segundo, Aksoy & Cinar (2009) a glândula nesta fase é revestida inicialmente por epitélio pseudoestratificado cilíndrico a simples cilíndrico, o que concorda com a descrição de Toner (1965), tornando-se cúbico por volta do 13º dia o que também foi verificado pelo autor, associando a diferenciação das células de revestimento e das glândulas proventriculares à ingestão de albúmen, sendo esta mudança em resposta adaptativa. Porém, Sgambati *et al.* (1996) e Aksoy & Cinar (2009) verificaram essa mudança no epitélio que forma a glândula por volta do 15º dia de incubação.

As características histoquímicas do proventrículo estão de acordo com Sgambati *et al.* (1996), que descreveu o epitélio superficial do 7º ao 10º dia com baixa produção de GAGs tanto ácidas como neutras, porém aumentando progressivamente a partir do 11º dia de incubação. A produção contínua de GAGs neutras e ácidas representa uma proteção da mucosa gástrica desde a fase inicial do desenvolvimento. No animal adulto, a muscular da mucosa é formada por uma camada interrompida de fibras musculares lisas, que se distribuem entre as glândulas proventriculares, localizadas na submucosa (BANKS, 1991). No entanto, pela coloração de Tricrômico de Gomori, os embriões de 12 a 20 dias de desenvolvimento

(estádio 37 a 45) apresentam a muscular da mucosa do proventrículo muito pouco evidente. Assim, a submucosa não pode ser classificada como camada devido à falta de uma estrutura bem definida, tendo sido considerado que as glândulas proventriculares estão localizadas no tecido conjuntivo da lâmina própria - submucosa.

As características histológicas e histoquímicas da moela *G. gallus* foram investigadas por Pinheiro et. al. (1989) e Sgambati et al. (1995). Pinheiro et al. descreveram o epitélio da mucosa como pseudoestratificado cilíndrico em embriões do 5º ao 15º dia do desenvolvimento, sendo que no 12º dia o epitélio da mucosa mostrou-se mais alto e com projeções na membrana apical. Verificou-se que a partir do 15º dia, o epitélio já apresenta a forma cúbica com núcleo esférico, e em fase de formação da glândula tubular. No período de seis a 12 dias, o epitélio de revestimento mostrou-se produtor de GAGs neutras na porção média e apical. Sgambati et al. (1995) e Toner (1966) descreveram o epitélio do 7º ao 9º dia consistindo-se de quatro a cinco camadas de células. Sgambati et al. (1995) observou, ainda, espaços intercelulares a partir do 14º dia de incubação, seguido de proliferação celular no tecido mesenquimal subjacente, característica essa que também reconheceu como a origem do primórdio das glândulas tubulares, concordando com os resultados deste estudo.

Sgambati et al. (1995, 1996) descreveram as diferenças na produção de GAGs no proventrículo e na moela de *G. gallus* durante o desenvolvimento embrionário, sugerindo que essas mudanças estejam relacionadas às diferenças fisiológicas destes órgãos. O presente estudo ainda inclui o esôfago, no qual também foram identificadas alterações histológicas e histoquímicas durante o desenvolvimento, concordando que estas sejam de caráter adaptativo e relacionadas à função do órgão e à fase do desenvolvimento embrionário.

6. CONCLUSÃO

✓ A mucosa do esôfago mostra-se revestida por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado e secretor. Os primórdios das glândulas esofágicas já estão presentes no 12º dia do desenvolvimento (estádio 37/38), apresentando-se ausentes na produção de GAGs até o 16º dia e fracamente do 17 a 18 dias. Somente a partir do 19º e 20º dia (estádios 45), as glândulas apresentam-se com características de glândulas mucosas e em plena produção de GAGs neutras e ácidas.

✓ O proventrículo aos 12 dias de desenvolvimento (estádios 37/38) apresentou-se revestido internamente por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. Por volta do 15º dia do desenvolvimento (estádio 41), o epitélio da mucosa se diferencia em cilíndrico simples mucossecretor, mostrando contínua produção de GAGs neutras e ácidas, desde a fase inicial do desenvolvimento (estádios 37 - 42).

✓ A mucosa da moela de embriões de 12 a 13 dias de desenvolvimento (estádios 37 a 40) mostrou-se recoberta por epitélio pseudoestratificado cilíndrico. A partir do 14º dia (estádio 40) o epitélio prolifera e invade o mesenquima subjacente. Após o 15º (estádio 41), o epitélio da mucosa diferencia-se e gradualmente torna-se simples cilíndrico. Após 16º dia (estádio 42) de incubação, as células apresentam-se em fase de reorganização. Formam-se espaços intercelulares originando as glândulas tubulares. A partir do 17º dia (estádio 43), as glândulas tubulares foram consideradas completamente formadas e produtoras de GAGs neutras e ácidas.

✓ As diferenças na produção de GAGs entre os três segmentos do trato gastroesofágico se devem, provavelmente, aos diferentes estádios do desenvolvimento, às funções e necessidades fisiológicas de cada segmento em reposta à adaptação progressiva do organismo à vida pós-eclosão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. N. C. A histochemical study of the stomach and intestine of the chicken. **Journal of Anatomy**, v. 92, p. 453-466, 1958.

AKSOY, A.; CINAR, K. Distribution and ontogeny of gastrin- and serotonin-immunoreactive cells in the proventriculus of developing chick, *Gallus gallus domestica*. **Journal of Veterinary Science**, v.10, n.1, p. 9-13, 2009.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ª edição, Manole, Rio de Janeiro, p. 462-463, 1992.

DE GROEF, B.; GROMMEN, S. V. H.; DARRAS, V. M. The chicken embryo as a model for developmental endocrinology: development of the thyrotropic, corticotropic, and somatotropic axes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 293, n. 1-2, p. 17-24, 2008.

DÍAZ, A. O.; GARCIA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Morphological and Histochemical Characterization of the Mucosa of the Digestive Tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935). **Anatomy, Histology, Embryology**, v. 32, p. 341-346, 2003.

FORDER, R. E. A; HOWARTH, G. S.; TIVEY, D. R.; HUGHES, R. J. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. **Poultry science**, v.86, n. 11, p. 2396-403, 2007.

FUKUDA, K.; YASUGI, S. The molecular mechanisms of stomach development in vertebrates. **Development, growth e differentiation**, v. 47, n. 6, p. 375-382, 2005.

GONZALES, E.; MACARI, M. **Manejo da incubação**. 2ª ed., Facta, v.13, pp. 53-56, 2003.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental Dynamics**, v. 195, n. 4, p. 231-372, 1951.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1ª ed., Elsevier, 383 p., 2012.

HODGES, R. D. **The histology of the fowl**. Academic Press London, 45-64p, 1974.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Guanabara Koogan, pp. 292, 2004.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histology and cell biology: an introduction to pathology**. 2ª ed., Elsevier, pp. 444-449, 2008.

KLASING, K. C. Avian gastrointestinal anatomy and physiology. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 42-50, 1999.

LANZIERI, P. D.; SALES, A.; VIEIRA, M. C. P. Caracterização histoquímica dos mucopolissacarídeos do esôfago, proventrículo e ventrículo da coruja mato (*Otus choliba choliba*). **Arquivos Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 3, n. 2, p. 19-22, 1973.

LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P. W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry science**, v. 86, n. 12, p. 2685-2691, 2007.

LIMAN, N.; ALAN, E.; KÜÇÜK BAYRAM, G. The differences between the localizations of MUC1, MUC5AC, MUC6 and osteopontin in quail proventriculus and gizzard may be a reflection of functional differences of stomach parts. **Journal of Anatomy**, v. 217, n. 1, p. 57-66, 2010.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. (2000). Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796–801

MÜLLER, Y. M. R.; DIAS, P. F. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n 5, p 233-233, 1998.

NIELSEN, C.; MURTAUGH, L. C.; CHYUNG, J. C.; LASSAR, A.; ROBERTS, D. J. Gizzard formation and the role of Bapx1. **Developmental biology**, v. 231, n. 1, p.164-74, 2001.

OLSEN, M. W. Maturation, fertilization and early cleavage in the hen's egg. **Journal Morphological**, v. 70, p. 59-106, 1940.

PATTERSON, J. T. Studies on the early development of the hen's egg: I. History of the early cleavage and of the accessory cleavage. **Journal Morphological**, v. 21, p. 101-134, 1910.

PIEL, C.; MONTAGNE, L.; SÈVE, B.; LALLÉS, J. P. Increasing Digesta Viscosity Using Carboxymethylcellulose in Weaned Piglets Stimulates Ileal Goblet Cell Numbers and Maturation. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 1, p. 86-91, 2005.

PINHEIRO, N. L.; GEORGE, L. L.; MOTA, D. L. Histogenesis and histochemistry of the secretion plate: detection of glycans and neutral glycoproteins synthesized by epithelial components of the gizzard mucosa of *Gallus gallus*. **Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch**, v.135, n. 3, p. 385-395, 1989.

RAJABI, E.; NABIPOUR, A. Histological study on the oesophagus and crop in various species of wild bird. **Avian Biology Research**, v. 2, n. 3, p. 161-164, 2009.

ROBERTS, D. J.; SMITH, D. M.; GOFF, D. J.; TABIN, C. J. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. **Development** (Cambridge, England), v. 125, n. 15, p. 2791-801, 1998.

ROSSI, J. R.; BARALDI-ARTONI, S. M.; OLIVEIRA, D.; CRUZ, C. D.; FRANZO, V. S.; SAGULA, A. Morphology of glandular stomach (Ventriculus glandularis) and muscular

stomach (Ventriculus muscularis) of the partridge *Rhynchotus rufescens*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1319-1324, 2005.

SANCAR-BAS, S., KAPTAN, E., SENGEZER-INCELI, M., SEZEN, A., US, H. Glycoconjugate Histochemistry in the Fundic Stomach and Small Intestine of the Frog (*Rana ridibunda*), **Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 93-104, 2009.

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. **Evolution e development**, v. 2, p. 6, p. 348-59, 2000.

SCOTT, G. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5ª ed., Funpec Editora, Ribeirão Preto-SP, pp. 167- 181, 2003.

SGAMBATI E.; BRYK, S. G.; GHERI, G. Histochemical study of the epithelial mucins in the gizzard of the chick embryo. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 101, n. 3, p. 173-185, 1996.

SGAMBATI, E., BRYK, S. G., GHERI, G. Histochemical characterization of the mucins of the epithelial cells in the chick embryo proventriculus. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 100, n. p. 83-97, 1995.

SHIN, M.; NOJI, S.; NEUBÜSER, A.; YASUGI, S. FGF10 is required for cell proliferation and gland formation in the stomach epithelium of the chicken embryo. **Developmental biology**, v. 294, n. 1, p. 11-23, 2006.

SHIN, M.; WATANUKI, K.; YASUGI, S. Expression of Fgf10 and Fgf receptors during development of the embryonic chicken stomach. **Gene expression patterns: GEP**, v. 5, n. 4, p. 511-516, 2005.

SIBBING, F.A.; URIBE, R. Regional specializations in the oro-pharyngeal wall and food processing in the carp (*Cyprinus Carpio* L.). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 35, p. 377-422, 1985.

STERN, C. D. The chick; a great model system becomes even greater. **Developmental cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.

TAKIGUCHI, K.; YASUGI, S.; MIZUNO, T. Developmental changes in the ability to express embryonic pepsinogen in stomach epithelia of chick embryos. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 56-62, 1988.

THORNTON, D. J.; ROUSSEAU, K.; MCGUCKIN, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 459-86, 2008.

TONER, P. G. Development of the acid secretory potential in the chick embryo proventriculus. **Journal of Anatomy**, v. 99, n. 2, pp 389-398, 1965.

TORNER, P. G. Ultrastructure of the developing gizzard epithelium in the chick embryo. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 73, n. 2, p. 220-233, 1966.

XU, J.; DELPROPOSTO, Z.; ZHOU, Z.; SHEN, H.; XUAN, S. Y.; LI, Q. H.; HAACKE, E. M.; HU, J. In ovo monitoring of smooth muscle fiber development in the chick embryo: diffusion tensor imaging with histologic correlation. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34009, 2012.

CAPITULO II

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA p53 DURANTE A MORFOGÊNESE DA MUCOSA
GASTROESOFÁGICA DE *Gallus gallus*
(LINNAEUS, 1758)**

VENTURA, Adriana. **Estudo imuno-histoquímico da expressão da proteína p53 durante a morfogênese da mucosa gastroesofágica de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia Animal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

RESUMO

A proposta deste estudo foi analisar a expressão da proteína p53 durante a ontogênese da mucosa gastroesofágica de *G. gallus* e correlacioná-la à histogênese das estruturas durante os estádios 37 a 46. Foram utilizados 24 embriões (de 12 a 20 dias) e o timo de dois animais adultos. A imuno-histoquímica foi realizada empregando-se o método indireto ABC. Os controles positivos e negativos foram realizados com cortes do timo de *G. gallus* jovem e adulto para testar a reatividade do anticorpo. A expressão da p53 na mucosa gastroesofágica mostrou-se crescente em relação à formação do órgão, principalmente nos estágios que iniciam a remodelação tecidual e a diferenciação celular. No esôfago, a partir dos estádios 42 e 43, foram observadas células imunorreativas (IR) no epitélio superficial e nos primórdios das glândulas esofágicas. No proventrículo, entre os estádios 39 e 45, foram observadas células IR entre as células epiteliais da mucosa e raramente nas glândulas proventriculares. Enquanto na moela, após o estágio 41° (16 dias de incubação), foram observadas células IR principalmente nas regiões medial e basal da camada epitelial da mucosa e tecido mesenquimal subjacente, principalmente nos espaços intercelulares que surgem nesta fase para formar os ductos das glândulas tubulares. A proteína p53 ocorre em momentos cruciais do desenvolvimento: no esôfago durante a remodelação das glândulas esofágicas em formação, no proventrículo na diferenciação do epitélio da mucosa, e na moela durante a formação das glândulas tubulares. Contudo, apesar da p53 participar da ontogênese da mucosa gastroesofágica, este estudo não permite afirmar que sua expressão seja essencial para seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Embriões de galinha, proteína p53, desenvolvimento.

VENTURA, Adriana. **Immunohistochemical study of the expression of protein p53 during the ontogenesis of the gastroesophageal mucosa of *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)**. 100p. Dissertation (Master in Animal Biology). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

ABSTRACT

In the present study we analyzed the expression of the protein p53 during the ontogenesis of the gastroesophageal mucosa of chicken (*G. gallus*) and correlated it with the histogenesis of particular structures during the stages 37 to 46. We used 24 embryos (at 12 to 20 days of incubation) and the thymus of two chickens. The immunohistochemical analysis was performed with the indirect method ABC. We made negative and positive controls with thymus slices of young and adult chicken, in order to test for the specificity of the primary antibody. The expression of p53 in the gastroesophageal mucosa increased during the formation of the organ, mainly in the stages in which tissue remodeling and cell differentiation began. In the esophagus, from stages 42 and 43, cells were observed in the IR surface epithelium and in early esophageal glands. In the proventriculus, from stages 39 to 45 were observed between the IR-cell (immunoreactive cells) of mucosa epithelial and rarely proventricular glands. While in the gizzard, after the stage 41 (16 days incubation) IR cells were observed mainly in the medial basal epithelial layer of the mucosa and subjacent mesenchyme, especially in the intercellular spaces arising in this phase to form the tubular gland ducts. The protein p53 occurs at key stages of development: in the esophagus during the remodeling of esophageal glands, in the proventriculus during the differentiation of the epithelium of the mucosa, and in the gizzard during the formation of tubular glands. However, although p53 participates in the ontogenesis of the gastroesophageal mucosa, we cannot say whether p53 expression is essential for its development.

Key words: Chicken embryos, protein p53, development.

1. INTRODUÇÃO

A ontogênese envolve uma série de eventos como a proliferação e apoptose que irão resultar no desenvolvimento normal do embrião. A morte celular fisiológica se opõe à proliferação e durante o desenvolvimento permite esculpir estruturas vestigiais à sua forma padrão, separar camadas de tecidos, abrir de lúmens em órgãos tubulares, e selecionar células viáveis aos sistemas nervoso e imune (SAUDERS, 1966; MEIER *et al.*, 2000; ENTEZARI; ZAKERI; LOCKSHIN, 2010; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Eventos como a diferenciação, proliferação e apoptose são precisamente orquestrados por genes, como o *p53* (ENTEZARI; ZAKERI; LOCKSHIN, 2010). Este gene já foi descrito durante o desenvolvimento em várias espécies de animais (WALLINGFORD *et al.*, 1997; KRINKA *et al.*, 2001; MOLCHADSKY *et al.*, 2008; RINON *et al.*, 2011). A proteína *p53* é um produto da transcrição do gene *p53* (LEVINE *et al.*, 2004). Desempenha um importante papel na ontogênese de vertebrados, podendo ser considerada como uma “guardiã da diferenciação” por manter o equilíbrio mútuo como um regulador chave de eventos durante a diferenciação de células mesenquimais (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Sua participação já foi descrita no desenvolvimento de *Xenopus laevis* (WALLINGFORD *et al.*, 1997), camundongos, zebrafish (MOLCHADSKY *et al.*, 2008) e de *Gallus gallus* (KRINKA *et al.*, 2001; RINON *et al.*, 2011). Foi, ainda, relatada durante a diferenciação celular em vários estádios embrionários como a gastrulação, neurulação, cardiogênese, miogênese e adipogênese em diferentes espécies (WALLINGFORD *et al.*, 1997; KRINKA *et al.*, 2001; MOLCHADSKY *et al.*, 2008, LU; AMATRUDA; ABRAMS, 2009; RINON *et al.*, 2011). Descoberto em 1979, o gene *p53* é conhecido como “guardião do genoma”, por desempenhar controle-chave do ciclo celular, regulando a proliferação ao promover a apoptose. Sendo que a integridade de vários tipos celulares está relacionada às funções desta proteína que é sintetizada em células normais (DELEO *et al.*, 1979 apud BAI & ZHU, 2006; CRAWFORD, 1983 apud SOUSSI & MAY, 1996; LEVINE & OREN, 2009; SOUSSI, 2010).

Durante o desenvolvimento, a proteína *p53* é expressa em momentos específicos da diferenciação de tecidos, cuja função tem se mostrado versátil entre as espécies, ou seja, ora estimula, ora bloqueia a diferenciação (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Em algumas espécies ela pode ter uma função essencial, enquanto em outras sua deficiência ou bloqueio pode ser compensado por suas isoformas (WALLINGFORD *et al.*, 1997; MOLCHADSKY *et al.*, 2008), indicando que as aquisições evolutivas entre os táxons exigiram mudanças necessárias para o controle genético da ontogenia. Portanto, há uma importante relação da estabilidade entre estruturas, funcionamento e evolução desta proteína que a mantém conservada entre os vários filós que vão desde protozoários até vertebrados (PINTUS *et al.*, 2007). No entanto, a função da *p53* durante a ontogênese ainda não está precisamente elucidada (RINON *et al.*, 2011), porém, vem sendo sugerido que a sua função seja como um controlador chave no processo de diferenciação (MOLCHADSKY *et al.*, 2008) e um fator anti-teratogênico (ALMOG e ROTTER, 1997).

A perda do controle dos diferentes eventos durante a ontogênese pode induzir a muitas anormalidades e teratogênias. Estudos que visam a elucidar os mecanismos e genes que decidem a morte celular, como a proteína *p53* e sua participação em momentos específicos da diferenciação, proliferação celular e apoptose, contribuem para o entendimento do desenvolvimento embrionário. Portanto, a proposta deste estudo foi analisar a expressão desta proteína durante a morfogênese da mucosa gastroesofágica de *Gallus gallus* e correlacioná-la

à histogênese de estruturas presentes nesses segmentos durante os principais estádios de seu desenvolvimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morte celular por apoptose

A morte celular foi relatada pelo alemão Carl Vogt em 1842, reconhecendo a morte celular como um fenômeno natural que ocorre em vertebrados (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; VAUX, 2002). Mas, somente ganhou destaque científico após um século, quando vários cientistas redescobriram a morte celular durante o desenvolvimento e a reconheceram como um fenômeno fisiológico que ocorria em diferentes períodos tanto do desenvolvimento como durante a vida pós-natal (GLUSCKSMAN, 1951 apud JACOBSON *et al.*, 1997; SAUDERS, 1966 ; VAUX, 2002; ZAKERI & LOCKSHIN, 2007). Porém, esse fenômeno não era bem esclarecido e suas características ainda não eram diferenciadas da morte celular por necrose, ou seja, causada por uma patologia. Inicialmente foi utilizado o termo *microbiose* para reconhecer a morte celular sem causa patológica (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Gluscksmann em 1951 (*apud* JACOBSON *et al.*, 1997) e Sauders em 1966 relataram a morte celular durante o desenvolvimento, reconhecendo a importância de retirada de células no processo ontogênico, identificando-o como mecanismo morfogenéticos e da histogênese de aquisição da forma. Seus estudos indicavam que a retirada de células resultava na remodelação de órgão, formação de dígitos, involução de vestígios filogenéticos. Em 1966, Sauders ainda concluiu em seu trabalho que a morte de células é programada por eventos morfogenéticos normais em organismos multicelulares, e que esta pode ser explorada dentro do mesmo contexto que o crescimento e a diferenciação celular.

A morte celular por apoptose foi reconhecida, caracterizada e descrita por Kerr , Wyllie & Currie (1972), verificando que as células apresentavam um rápido encolhimento e convertendo-se em pequenas massas de citoplasmas contendo partículas da cromatina nuclear. Percebeu que estas massas eram englobadas e digeridas por células fagocitárias mononucleares. Inicialmente esta desintegração celular foi descrita como um tipo de necrose por encolhimento, chamada de “*Shrinkage necrosis*” (KERR, 2002).

Estudos ultraestruturais demonstraram morfologicamente as características que ocorrem durante a morte de células saudáveis como condensação, agregação e compactação da cromatina, fragmentação do citoplasma e do núcleo, formação de corpos contendo estes fragmentos citoplasmáticos que, posteriormente eram fagocitados e digeridos por células fagocitárias (Ilustração 3). A morte celular pode ocorrer tanto em células normais como em células neoplásicas, sugerindo tratar-se de um fenômeno pré-ordenado e geneticamente determinado (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; KERR, 2002). Contudo, somente em 1972, Kerr, Wyllie & Currie reconheceram o processo de apoptose como um fenômeno biológico vital e essencial para homeostase de vários sistemas, intrinsecamente controlada por estímulos intrínsecos e extrínsecos à própria célula.

Em 1972, Kerr, Willie & Currie introduziram o termo apoptose, reconhecendo a morte celular programada como fisiológica e orquestrada por mecanismos endógenos, sob influência da própria célula e tecidos adjacentes. O termo apoptose foi sugerido para descrever a eliminação silenciosa de células pelo organismo. Em grego, a palavra apoptose é usada para descrever “*dropping off*” ou “*falling off*” de pétalas de flores ou folhas de árvores que caem durante o outono, descrevendo-o como um fenômeno essencial e necessário para renovação e continuidade da vida (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WYLLIE, 1974).

Os corpos apoptóticos formados não demonstraram evidências de alterações degenerativas, apresentavam citoplasma intacto e mesmo livres no meio extracelular,

marcados para serem eliminados e irreversivelmente comprometidos ainda exibiam atividade metabólica. Identificaram ainda a ausência de resposta inflamatória e o rápido desaparecimento dos corpos apoptóticos devido à ação lisossômica de fagócitos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Morfologicamente apoptose difere em muitos aspectos de necrose de coagulação (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), pois envolve células individuais, sem afetar as células adjacentes que permanecem viáveis, mantendo o conjunto estrutural do tecido. Não há reação inflamatória. As células apoptóticas aparecem na microscopia de luz de maneira discreta, pequenas em relação às células normais adjacentes e frequentemente apresentando núcleo picnótico e fragmentado (WYLLIE, 1974).

Desde que foi descrita por Kerr, Wyllie & Currie (1972), as características de células em apoptose tornaram-se referências para todos os estudos posteriores. As manifestações histológicas da célula apoptótica são: encolhimento celular, perda da coesão intercelular e aderência com a matriz extracelular. As organelas geralmente mantêm a morfologia, com exceção de alguns casos, como as mitocôndrias que podem ter sua membrana externa rompida. Ocorre condensação da cromatina e fragmentação do conteúdo nuclear. A seguir, a membrana celular forma projeções, ocorre fragmentação citoplasmática e a célula se desintegra em vesículas delimitadas pela membrana celular, chamadas de corpos apoptóticos. Estes são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (NAGATA & GOLSTEIN, 1995; ZIEGLER, *et al.*, 2004).

Kerr, Wyllie & Currie (1972) ainda sugeriram que as células eram rapidamente fagocitadas devido às mudanças na propriedade de suas membranas. Estudos posteriores identificaram um fosfolípido da membrana celular, a fosfatidilserina (PS), como marcador de membrana de células apoptóticas, identificando-a como “*eat-me signal*” (FADOK *et al.*, 1998; SAVILL & FADOK, 2000), pois ao ser exposta na face externa da membrana celular indica aos leucócitos que a célula deve ser fagocitada (FADOK *et al.*, 1998; SAVILL & FADOK, 2000, ROUCOU *et al.* 2001). A PS é um fosfolípido de membrana, exclusivamente restrito ao folheto interno da membrana plasmática. A externalização da PS na membrana da célula durante a apoptose foi reconhecida em 1992, sendo considerada a partir de então como um marcador universal de células apoptóticas. A primeira identificação de célula em apoptose foi em linfócitos, e mais tarde em todos os tipos de células, incluindo neutrófilos, células tumorais, células musculares e espermáticas, comprovando que a externalização da PS é uma característica universal da célula em apoptose (FADOK *et al.*, 1998; SAVILL & FADOK, 2000).

A morte celular por apoptose pode ser ativada por dois mecanismos principais: a via intrínseca e a extrínseca em resposta a diferentes tipos de sinais. A via intrínseca é também chamada de via mitocondrial devido ao envolvimento essencial da mitocôndria. Esta organela onde proteínas anti e pro-apoptóticas interagem e determinam o destino da célula, é também o local onde originam-se os sinais capazes de ativar caspases (grupo de cisteínas proteases capazes de clivar vários substratos celulares para desintegrar o conteúdo celular), elas existem na célula na forma de proenzimas ou zimogênios inativos (WANG & YOULE, 2009).

A via extrínseca assim chamada por ser ativada por ligantes externos que interagem com sítios de receptores-morte como Fas, TNF (fator de necrose tumoral), TRAIL (Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand), ativando cascatas enzimáticas no meio intracelular que resultarão em apoptose (WANG & YOULE, 2009).

Além disso, no meio intracelular existem mecanismos celulares que controlam a apoptose, como as caspases. As caspases 8 e 10 são ativadas quando ligantes específicos ativam a via extrínseca ligando-se aos seus receptores, enquanto a caspase 9 é ativada na

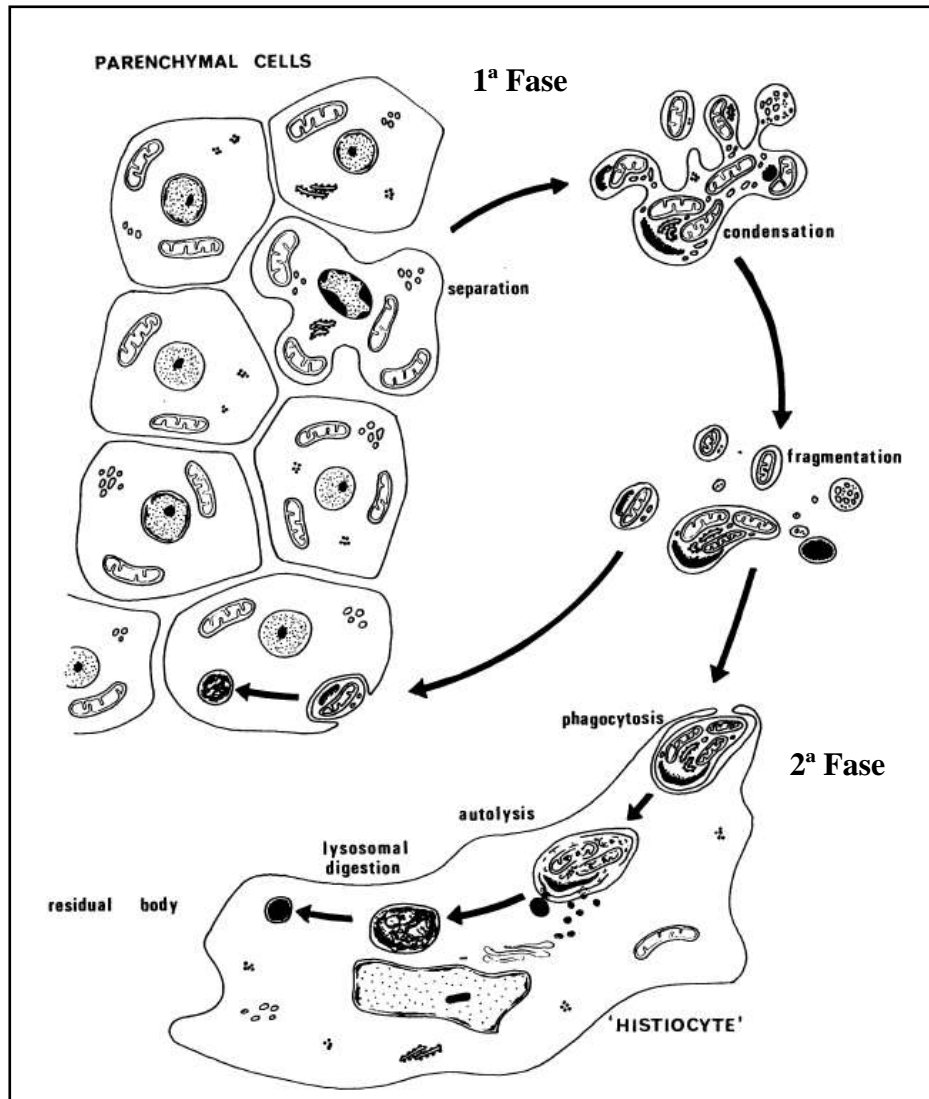


Ilustração 4. Diagrama para ilustrar as características morfológicas de apoptose, demonstrando duas fases distintas: primeira, compreende a formação de corpos apoptóticos e, segunda, sua fagocitose e degradação. Fonte: (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972)

membrana mitocondrial, pela via intrínseca (WYLLIE, 2010).

A existência de um controle genético para o processo de apoptose foi primeiro elucidado a partir de estudos em *Caenorhabditis elegans*, durante a ontogênese do nematódeo, 131 células foram eliminadas por apoptose das 1090 células somáticas produzidas, formando o animal adulto com 959 células. A partir destes estudos identificaram a base genética que controla a regulação e execução da morte celular (HENGARTNER, 1997; MEIER *et al.*, 2000; JOZA; KROMER; PENNINGER, 2002).

A morte celular por apoptose é essencial para o sucesso do desenvolvimento embrionário (DANIAL & KORSMEYER, 2004), portanto, estudos de genes pró-apoptóticos, como o *p53* expresso durante o desenvolvimento de diferentes espécies e na morfogênese de vários tipos de tecidos (WALLINGFORD *et al.*, 1997, KRINKA *et al.*, 2001, MOLCHADSKY *et al.*,

2008, LU; AMATRUDA; ABRAMS, 2009), tornam-se imprescindíveis para compreensão dos mecanismos e genes que controlam a apoptose e, conseqüentemente, possam elucidar as causas das alterações e anormalidades que podem interferir e ocorrer durante a ontogênese.

2.2 Proteína p53

O gene *p53*, conhecido como guardião do genoma (LANE, 1992), desempenha um papel chave no controle do ciclo celular, proliferação e apoptose. A sua atividade como guardião pode ser explicado pela capacidade de regular vários genes, pois se trata de um fator de transcrição específico que se liga ao DNA e ativa a transcrição de genes alvos, podendo influenciar ciclo celular e induzir a parada, apoptose e senescência (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). A proteína p53 foi descoberta em 1979 por Lane & Crawford e Linzer & Levine enquanto estudavam antígenos tumorais encontrados na célula hospedeira, formados a partir de um complexo viral onde a proteína complexa-se com o antígeno T do vírus símio 40 (SV-40) (LEVINE; MOMAND; FINLAY, 1991).

Como até 1970 as pesquisas se concentravam em mutações causadas por vírus, as primeiras observações relatadas foram sobre a forma mutante da proteína p53 (LANE & CRAWFORD, 1979 apud ALMOG & ROTTER, 1997). Portanto, inicialmente ela foi considerada como uma oncoproteína, identificada pela elevada concentração em células infectadas, mas isto ocorria devido à ação do retrovírus na célula hospedeira, pois tinha sua degradação comprometida quando complexada a oncoproteínas virais (LANE e BENCHIMOL, 1990; SOUSSI & MAY, 1996; LEVINE & OREN, 2009).

Durante a embriogênese, a p53 é expressa em diferentes tipos de tecidos, sugerindo que esta pode ter uma importante função no controle da proliferação, diferenciação e apoptose. A expressão da p53 varia entre os diferentes tipos de tecidos e estágios do desenvolvimento, verificando uma correlação inversa entre os estágios e a diferenciação dos tecidos, ou seja, quanto mais diferenciado o tecido menor é a concentração da proteína nas células. Acredita-se que há uma relação entre a conservação evolutiva da proteína p53 e a expressão desta em pontos importantes e específicos da diferenciação e do desenvolvimento embrionário (ALMOG e ROTTER, 1997).

Os membros da família p53 são relatados em muitos táxons além de vertebrados, como ascídias, cnidarians, platelmintos e outros invertebrados. Uma proteína similar a p53 foi descrita em protozoários, sugerindo que o surgimento desta família de genes claramente antecedeu o aparecimento de organismos multicelulares, tratando-se de genes que provavelmente existiam em um ancestral comum aos metazoários e protozoários (LU; AMATRUDA; ABRAMS, 2009). A conservação evolutiva da p53 através das espécies de invertebrados e vertebrados ressalta sua importância em muitos processos biológicos (Wade, Wang e Wahl, 2010), porém, as aquisições evolutivas desta proteína nos vertebrados exigiram mudanças no controle genético da ontogenia o que, por sua vez, pode ter causado mudanças adaptativas no gene *p53* e em suas isoformas, devido às exigências metabólicas mais complexas, como homotermia e outras características dos animais terrestres (PINTUS *et al.*, 2007).

Durante a ontogênese, a proteína p53 mostrou-se com funções variadas em diferentes espécies. Em embriões de camundongos, a p53 participa da diferenciação de vários tipos celulares, como mioblastos, queratinócitos, oligodendrócitos, tireócitos; durante a osteogênese inibe os osteoblastos, na miogênese esquelética participa da diferenciação dos mioblastos, na adipogênese inibe a diferenciação (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Porém, mesmo participando ativamente durante o desenvolvimento de camundongos, animais *knockout* ou

nulos para p53 desenvolvem-se normalmente, pois sua deficiência não prejudica o desenvolvimento do embrião. Durante a vida pós-natal essa deficiência predispõe o animal a desenvolver inúmeros processos neoplásicos, ainda na fase neonatal (WALLINGFORD *et al.*, 1997). Em *Xenopus laevis* o gene *p53* é o único responsável pela diferenciação do mesoderma, o que torna sua expressão essencial para o desenvolvimento (WALLINGFORD *et al.*, 1997, MOLCHADSKY *et al.*, 2008, LU; AMATRUDA; ABRAMS, 2009). Nos embriões de galinha, a proteína p53 foi descrita durante a formação da linha primitiva, em concentrações crescentes durante a gastrulação, neurogênese e na fase inicial da cardiogênese (KRINKA *et al.*, 2001; RINON *et al.*, 2011). Em zebrafish foi relatada durante a neurogênese e no desenvolvimento do trato intestinal. Além de apresentar uma função versátil durante o desenvolvimento como proposto (MOLCHADSKY *et al.*, 2008), a p53 também pode ser considerada como um fator anti-teratogênico (ALMOG & ROTTER, 1997).

A proteína Mdm2 promove controle chave regulando a estabilidade, tradução, localização na celular e atividade de transcrição da proteína p53, sendo essencial no controle da sua atividade durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos (WANG & JIANG, 2012). A Mdm2 também é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, onde é degradada por uma via de ubiquitinação. A Mdm2 promove a ubiquitinação da proteína p53 e degradação via poliubiquitinação proteossoma dependente, pois ao menos quatro ubiquitinas servem como um sinal para a degradação pelo proteossoma, regulando negativamente, sob determinadas condições pode promover a monoubiquitinação da p53 que modula a função da proteína. Este mecanismo não induz a degradação diretamente, mas pode induzir a mudanças na localização e função da Mdm2, contribuindo para o feedback negativo e positivo da p53 (WADE; WANG; WAHL, 2010).

A proteína p53 desempenha um papel crítico no controle do ciclo celular e em resposta a estresse e danos ao DNA, inibindo a proliferação e ou induzindo a apoptose. De modo geral, p53 desempenha o controle chave na célula pela ativação ou inibição da transcrição de genes alvos. Contudo, ela também pode interagir diretamente com fatores pro e anti-apoptóticas, iniciando a apoptose direta ou indiretamente no citoplasma, controlando mecanismos reguladores e executores de apoptose (CHIPUK, 2004, LEVINE & OREN, 2009).

Várias espécies expressam a proteína p53, o que indica sua conservação ao longo do processo evolutivo (SOUSSI & MAY, 1996; MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Sua principal função relatada é como supressora tumoral, entretanto, os invertebrados são animais pouco propensos a desenvolverem processos neoplásicos, sugerindo que a função da proteína p53 possa ser mais complexa na célula (SOUSSI & MAY). A proteína p53 desempenha um papel crítico na manutenção da estabilidade do genoma, responde a danos ao DNA e outros tipos de estresse celular, podendo inibir a proliferação ou induzir a morte celular quando esta se torna inevitável. Além de controlar processos fisiológicos específicos tais como senescência celular, envelhecimento, desenvolvimento e algumas funções metabólicas (STIEWE, 2007; HU *et al.*, 2008). Apesar de consolidada como uma “guardiã tumoral” (LANE, 1992), considerada como “guardiã da diferenciação” celular (MOLCHADSKY *et al.*, 2008) e como um fator anti-teratogênico (ALMOG & ROTTER, 1997), contudo, a função precisa p53 durante a embriogênese ainda não está totalmente elucidada (RINON *et al.*, 2011), o que a torna um importante alvo de estudos durante o desenvolvimento, pois em algumas espécies a p53 está diretamente relacionada ao sucesso do desenvolvimento.

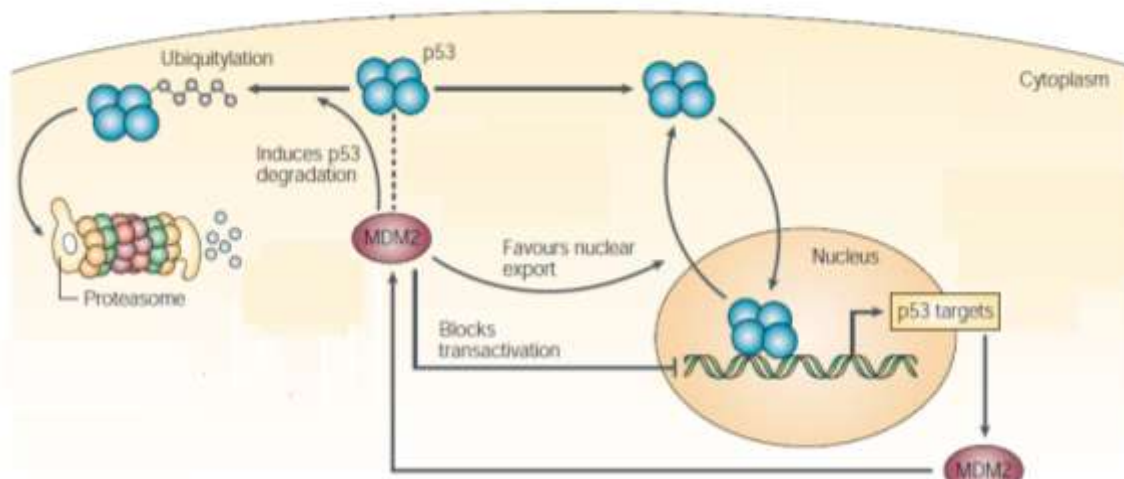


Ilustração 5. Regulação da p53 por Mdm2. A proteína Mdm2 promove *feedback* negativo da p53. Mdm2 inibe a atividade da p53 uma vez que bloqueia a sua atividade de transcrição, favorece a sua exportação nuclear e estimula a sua degradação. Diferentes sinais celulares, tais como danos ao DNA, ou a ativação de oncogenes, induzem a ativação de p53. Danos ao DNA favorecem a fosforilação da p53, impedindo a sua associação com MDM2. Modificado de CHÉNE, 2003.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos embriões

Foram utilizados 26 espécimes, sendo 24 embriões de 12 a 20 dias classificados nos estádios 37 a 45, segundo Hamburger e Hamilton (HH), 1951; e o timo de dois espécimes adultos, de *G. gallus domesticus*, da raça Leghorn, oriundos da Granja Tolomei, Rio de Janeiro, Brasil. A incubação foi realizada em incubadora digital, com temperatura (37,5°C) e umidade (60%) controladas automaticamente. Os embriões foram eutanasiados por hipotermia (método por congelamento a 4°C por 4 horas), de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CRMV, protocolo 189/2011 processo 23011792/2011-31 aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da UFRRJ (anexo A). Em seguida, os embriões foram dissecados para retirada do esôfago, proventrículo e moela.

3.2 Processamento tecidual e análise histológica

Após a coleta do material, os órgãos foram fixados em líquido de Bouin por oito horas e, em seguida, mantidos em álcool 70° GL, até serem processados pela técnica histológica de rotina que consiste em desidratação em séries crescentes de etanol (70 a 100%), diafanização em xilol e inclusão em Histosec-Paraffin para obtenção de cortes histológicos de 3µm espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise da estrutura tecidual; e submetidas à técnica de imuno-histoquímica.

3.3 Observações e fotomicrografias

Fotomicrografias de todos os exemplares foram obtidos com câmera digital Nikon Coolpix 4300, acoplada ao microscópio Nikon Elipse E100.

3.4 Imuno-histoquímica

Para a técnica de imuno-histoquímica foram feitos cortes com 3 µm de espessura, montados em lâminas pré-tratadas com *poly-L-lysine* a 0,1%, depois foram desparafinizados e re-hidratados segundo o protocolo empregado. As lâminas foram incubadas em EDTA (pH 8,0 a 0,1M) e colocadas em forno de microondas por 15 minutos para recuperação antigênica. Em seguida, incubadas com solução a 3% de H₂O₂ em metanol por 15 minutos para promover o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, os cortes foram incubados em solução de soro bovino normal a 1:100 µl em diluente (antibody diluent, catalog number ADS 125, marca Spring Bioscience, vide anexo C) em câmara úmida por 30 minutos, a temperatura ambiente. Logo após, foram incubadas com anticorpo primário anti-p53 (Mouse monoclonal Mab240, unconjugated antibody, catalog number AHO0112, marca Invitrogen – vide em anexo B) na diluição 1:50 µl por *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado “Universal” (diluído na proporção 1:200 µl) por 30 minutos, sendo, em seguida, incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, bula em anexo D), por 30 minutos na diluição 1:200 µl. Na sequência, a reação foi revelada com cromógeno Stable DAB/Plus (conferir em anexo E), preparado de acordo com as instruções do kit. Todas as diluições foram realizadas utilizando o *antibody diluent*. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, lavados em água destilada, desidratados em séries de etanol e montadas usando Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). O controle negativo foi feito pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por soro normal bovino não imune. Os controles positivos consistiram em cortes de carcinoma mamário humano, conforme indicação na bula do produto (vide em anexo B), cedidos pelo fornecedor

Biogen Brasil. Para validação da especificidade da reação imuno-histoquímica em relação à espécie foi utilizando cortes de timo de *G. gallus*.

Princípio: o anticorpo (anti-p53) reagirá com sítios específicos do antígeno, que neste estudo é a proteína p53 endógena. O cromógeno DAB identificará a imunorreação ao precipitar os sítios antigênicos positivos, tendo, então como resultado o núcleo da célula IR corado em castanho a marrom escuro (Ilustração 5).

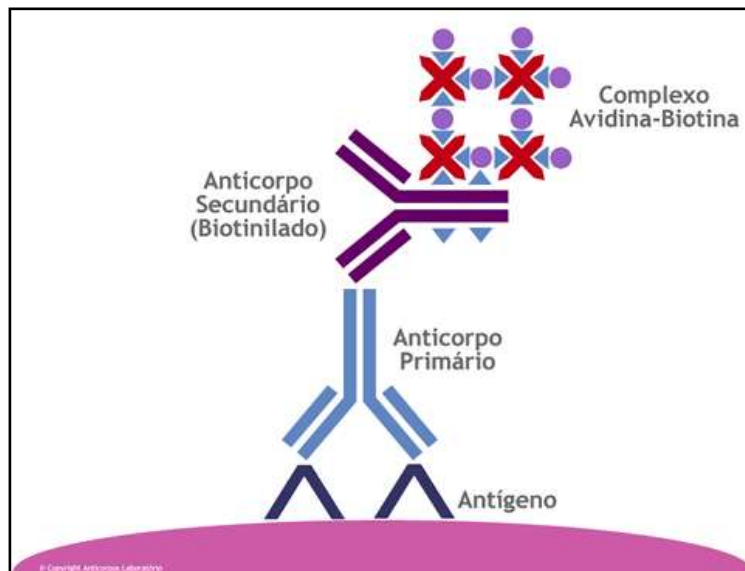


Ilustração 6. Representação do método imuno-histoquímico ABC - Complexo avidina-biotina-peroxidase formado pela ligação de uma molécula de (strept) avidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase). A Peroxidase do sistema de detecção de anticorpo reage com o substrato em água oxigenada para degradá-lo, que então reage com DAB, precipitando-o em sítios positivos produzindo uma cor marrom escuro a castanho.

4. RESULTADOS

4.1 Esôfago

A mucosa do esôfago de embriões de galinha nos estádios 37 a 41 (12 a 15 dias) é constituída por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, lâmina própria de tecido conjuntivo e muscular da mucosa. O primórdio da glândula esofágica é observado no estádio 37-38, ou seja, por volta dos 12 dias de desenvolvimento, surgindo como brotamento de células epiteliais que se introduzem no tecido conjuntivo em arranjo circular. As células da glândula primordial apresentam o formato variando de globoso a cúbico, com o núcleo esférico, semelhante ao do epitélio de revestimento. Nos estádios 41 e 42, aproximadamente 16 e 17 dias de desenvolvimento, é observada luz nas glândulas esofágicas primordiais. As células que formam a glândula passaram a exibir uma ou duas camadas de células ainda com o formato cúbico. Nesta fase, apenas as células da superfície epitelial indicam a expressão da proteína p53, caracterizada pela marcação nuclear.

Somente a partir dos estádios 42, por volta do 17º dia de desenvolvimento, o primórdio da glândula esofágica passa a sofrer alterações morfológicas para formar a glândula esofágica do tipo mucosa, as células passam de cúbicas com o núcleo central e esférico para formato cilíndrico, com núcleos periféricos na região basal. Entre os estádios 37 e 41 (por volta do 12º e 15º dia do desenvolvimento), as células imunorreativas (IR) foram raramente encontradas no epitélio superficial e na glândula esofágica em formação (Figura 38). Entretanto, a partir do 16º dia de desenvolvimento (estádio 42), foram observadas células IR tanto no epitélio de revestimento (Figuras 39 e 40 A e B) quanto nos primórdios das glândulas esofágicas (Figura 41 A e B). As células reativas à p53 exibem o núcleo corado em castanho.

4.2 Proventrículo

Nos estádios 37 até 40 (12 - 14 dias), o proventrículo é revestido pelo epitélio pseudoestratificado cilíndrico, as glândulas proventriculares surgem de invaginações deste epitélio e até o estádio 39, por volta do 13º dia de desenvolvimento apresentam-se como retas e simples, tornando-se ramificadas nos estádio 39 a 40 do desenvolvimento (13 a 14 dias). No estádio 42 (16 dias), o epitélio da camada mucosa torna-se cilíndrico simples mucossecretor. Rapidamente, o proventrículo adquire o aspecto e a morfologia do órgão adulto, as células das glândulas proventriculares passam a apresentar o formato cúbico e núcleo esférico. A muscular mucosa é pouco evidente até o estádio 45 (19-20 dias). Nos estádios iniciais do desenvolvimento proventricular, foram detectadas raras células imunorreativas a p53, sendo em sua maioria células epiteliais dispersas no lúmen do órgão (Figura 42 A). Entre os estádios 39 e 45 (13 a 20 dias de incubação), células reativas à p53 foram observadas entre as células epiteliais da mucosa (Figura 42) e raramente nas glândulas proventriculares.

4.3 Moela

Do estágio 37 até o 40 (12 a 14 dias), a moela é revestida por epitélio pseudoestratificado cilíndrico, não havendo vestígio da glândula tubular primordial. Por volta dos estádios 41-42 do desenvolvimento (15 e 16 dias), o epitélio apresenta-se em fase de reorganização e diferenciação para formar as glândulas tubulares. As células epiteliais e mesenquimais proliferam-se, tornando a camada epitelial mais alta. Nesta fase, várias células da região medial e basal perdem a coesão, formando espaços intercelulares ou lacunas que dão origem aos ductos da glândula tubular.

Nos estádios iniciais (37 até 40), foram detectadas raras células IR a p53 na mucosa da moela. Nos estádios posteriores ao 41º (15 dias de incubação), estas células são encontradas principalmente nas regiões medial e basal da camada epitelial (Figura 44 A e B; Figura 45). Após o estágio 41, as células epiteliais passam por intensa reorganização para formar as glândulas tubulares. Células IR também foram identificadas na luz das glândulas ainda em formação. Essas células apresentam características histológicas de células em apoptose (Figura 45 a 47), indicando o descarte destas para formar a luz das glândulas tubulares. Foi observada expressão da p53 em células do tecido conjuntivo mesenquimal.

4.4 Controles

O timo de *G. gallus* (Figura 48) foi utilizado como controle para testar a especificidade do Ac anti-p53 com a espécie alvo deste estudo. No controle positivo realizado com cortes de timo foi detectada a expressão de células IR a p53, principalmente na região cortical (Figura 49 A e B), enquanto nos cortes utilizados como controles negativos não foram detectadas imunorreações (Figura 50). No controle positivo de carcinoma mamário humano foram identificadas células IR a p53 (Figura 51), diferente do que ocorreu no controle negativo (Figura 53).

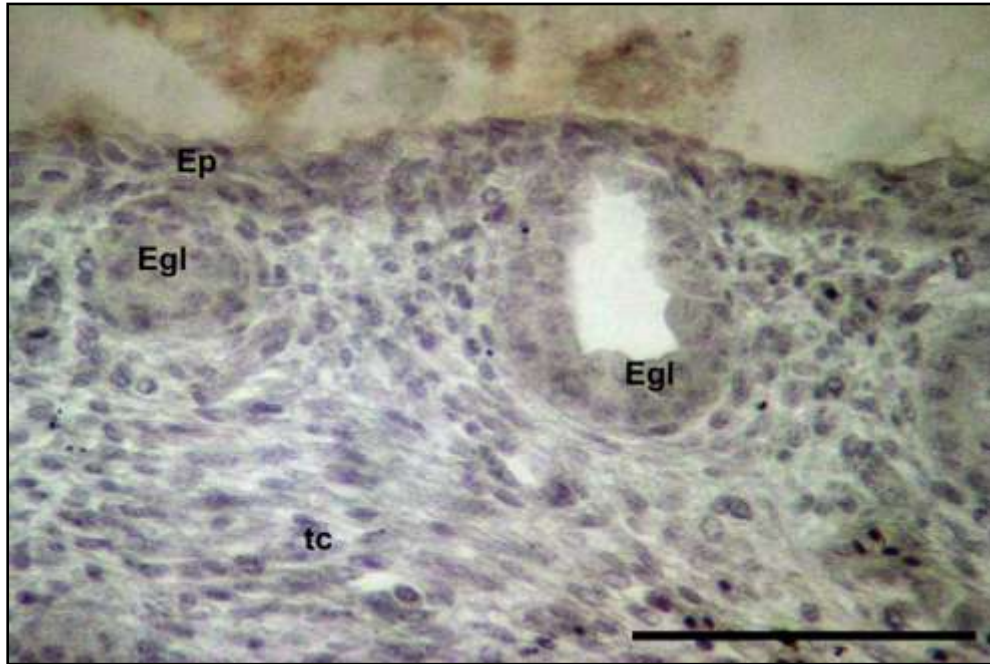


Figura 38. Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 39 (13 dias), ausência de células IR à p53 na glândula esofágica primordial. Ep = Epitélio, Egl = Glândula esofágica, tc = Tecido conjuntivo. Barra = 50µm.

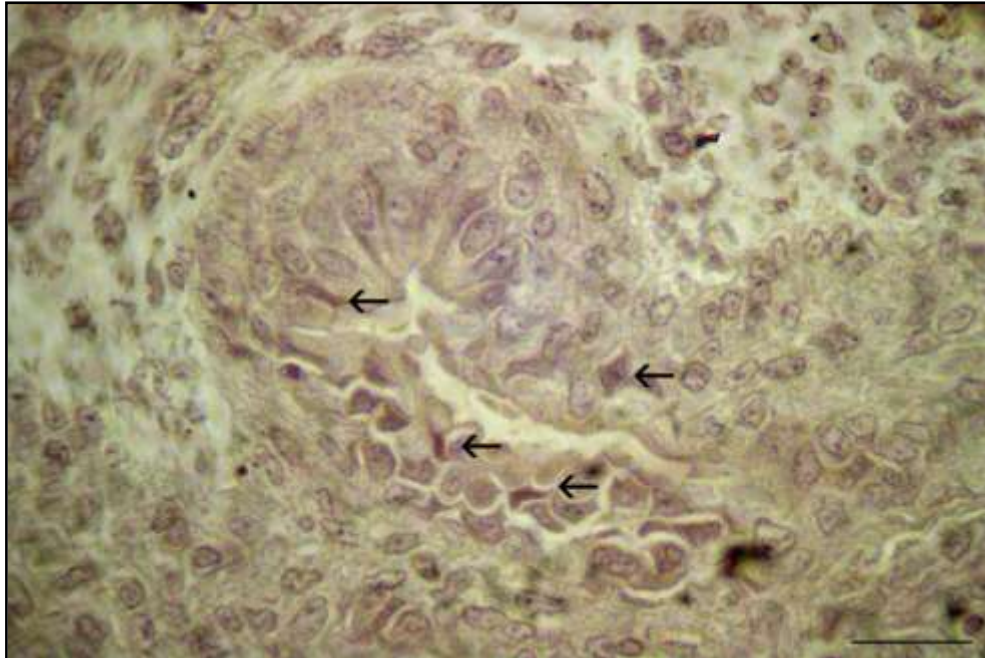


Figura 39. Fotomicrografia do esôfago de embrião no estágio 41 (16 dias). Células IR à p53 na mucosa. Ep = Epitélio, Setas= células imunorreativas. Barra = 50µm.

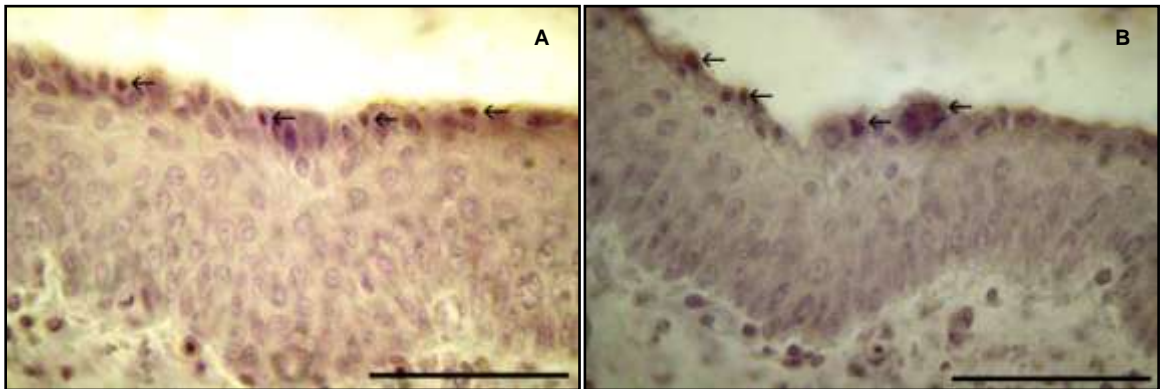


Figura 40. Fotomicrografia do esôfago de embrião no estágio 45 (19 dias) com células IR ao anticorpo anti-p53 no epitélio superficial (A e B). Setas = células imunorreativas. Barra = 50 μ m.

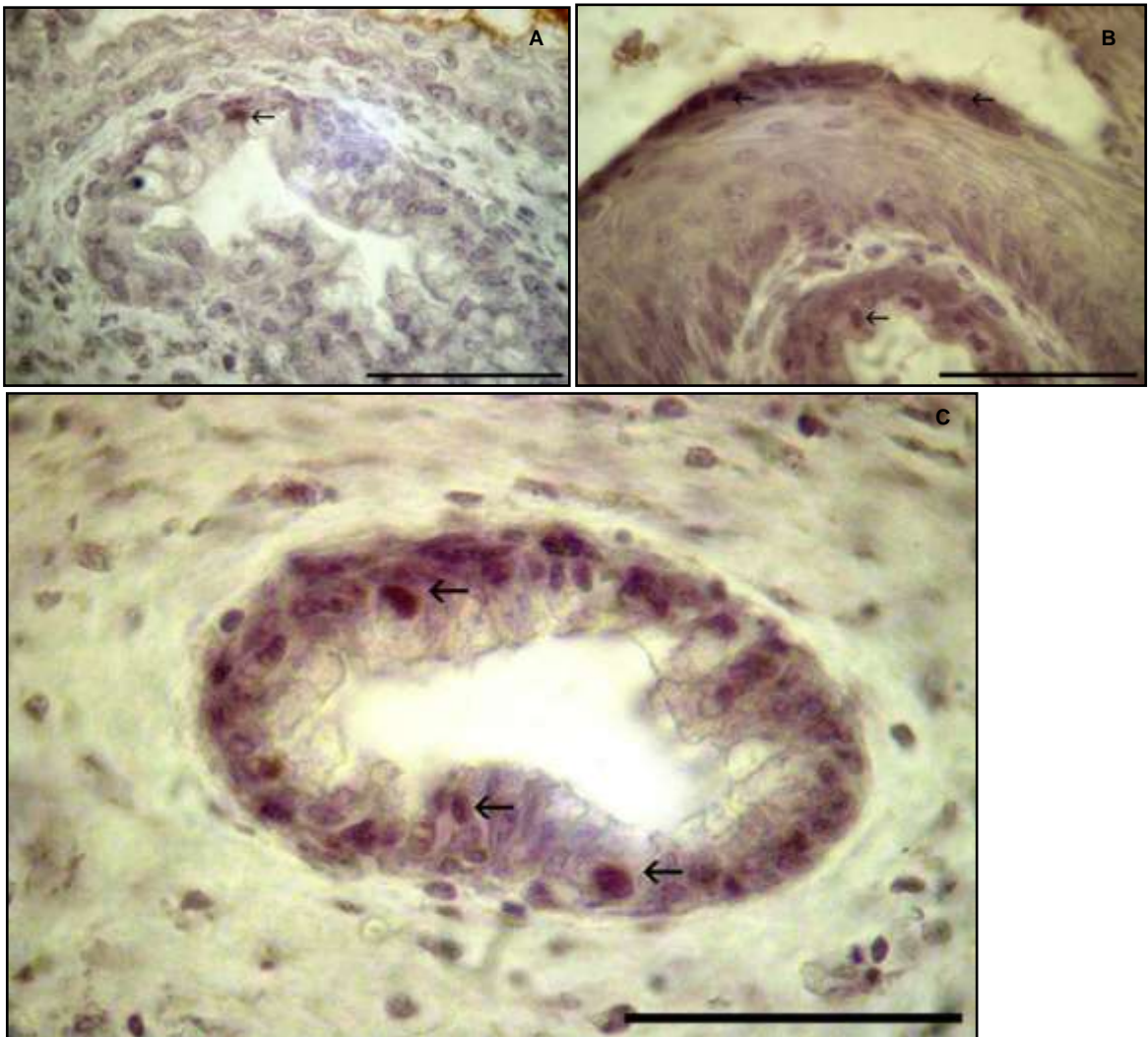


Figura 41. Fotomicrografia do esôfago de embriões no estágio 44 (19 dias) com células imunorreativas ao anticorpo anti-p53 no epitélio de revestimento e na glândula esofágica primordial (A, B e C). Setas= células imunorreativas. Barra = 50 μ m.

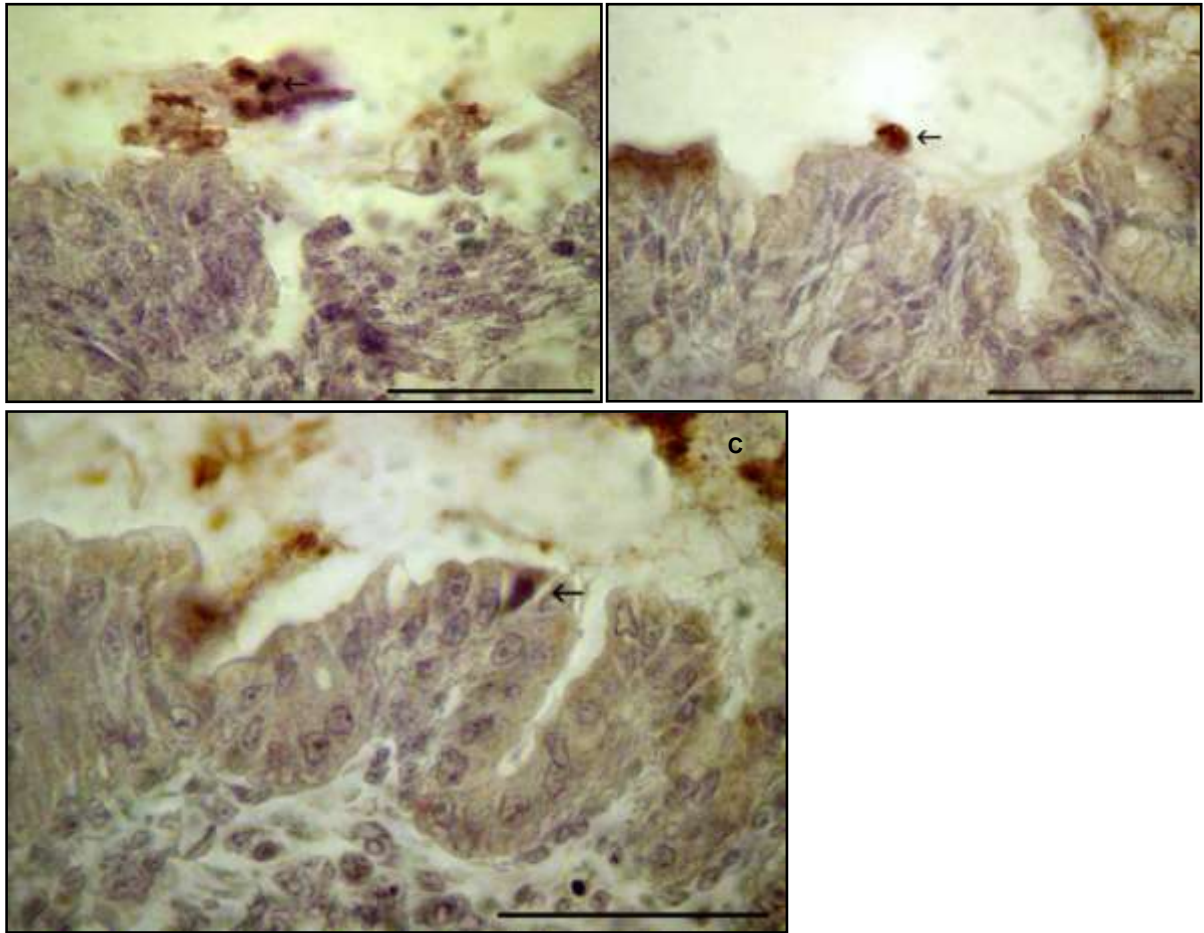


Figura 42. Fotomicrografia do proventrículo de embriões no estágio 37 (12 dias) com células IR à p53 soltas no lúmen (A). Células IR na mucosa em embriões no estágio 39 (B) e 41 (C). Setas = células imunorreativas. Barra = 50 μ m.

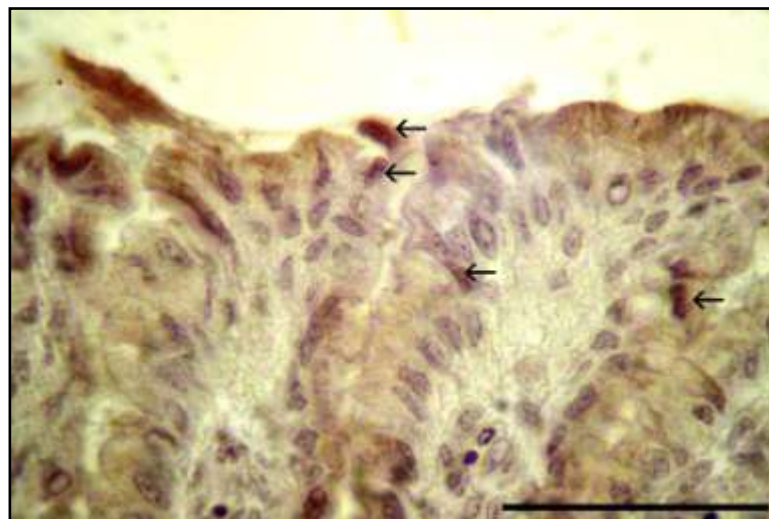


Figura 43. Fotomicrografia do proventrículo de embriões no estágio 44. Região de transição entre o proventrículo e a moela com células imunorreativas no epitélio superficial. Setas = células imunorreativas. Barra = 50 μ m.

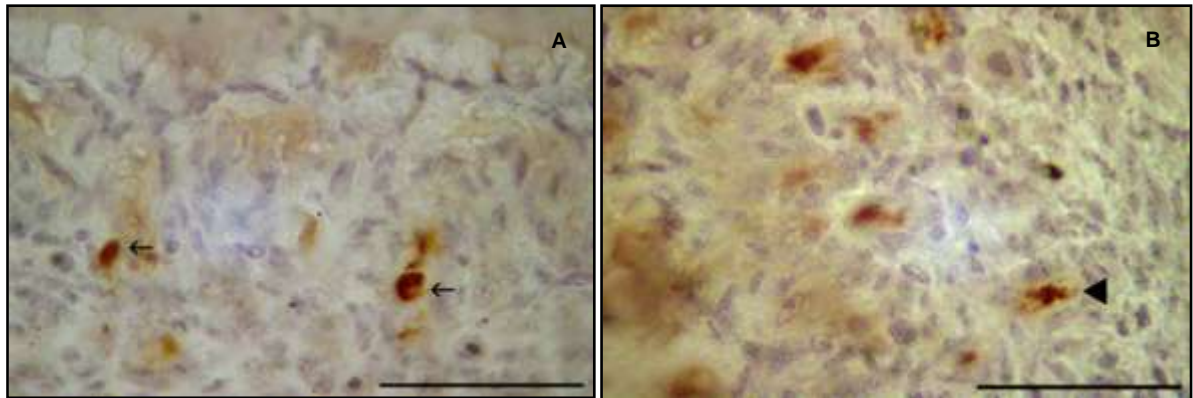


Figura 44. Fotomicrografia da moela de embriões *G. gallus* no estágio 42 (16 dias) com células IR à p53 na mucosa (A e B). Setas = Células IR. Barra = 50 μ m.

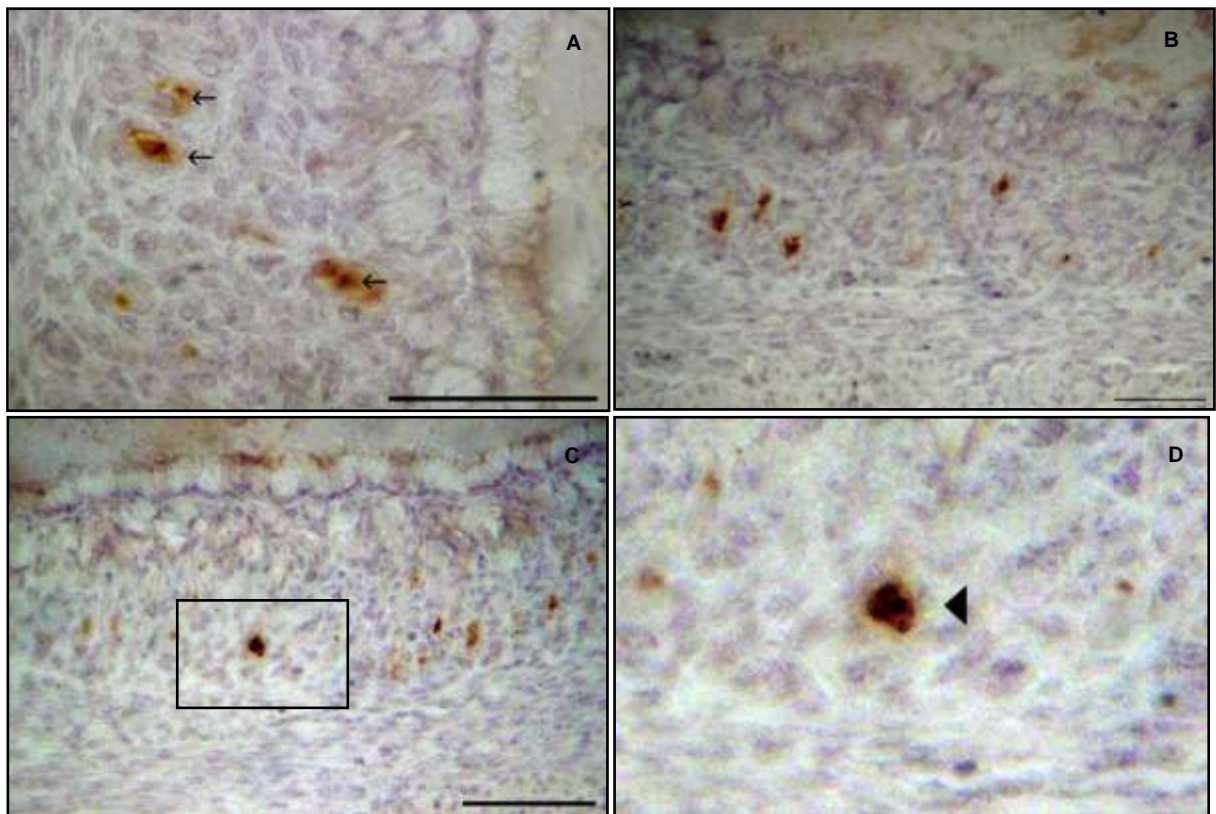


Figura 45. Fotomicrografia da moela de embriões *G. gallus* no estágio 42 (16 dias) com células IR à p53 no epitélio superficial e células mesenquimais subjacentes em A, B e C. Célula IR com núcleo fragmentado (D). Célula IR demonstrando o núcleo fragmentado, corado em castanho. Setas e cabeça de setas= Células IR. Barra = 50 μ m.

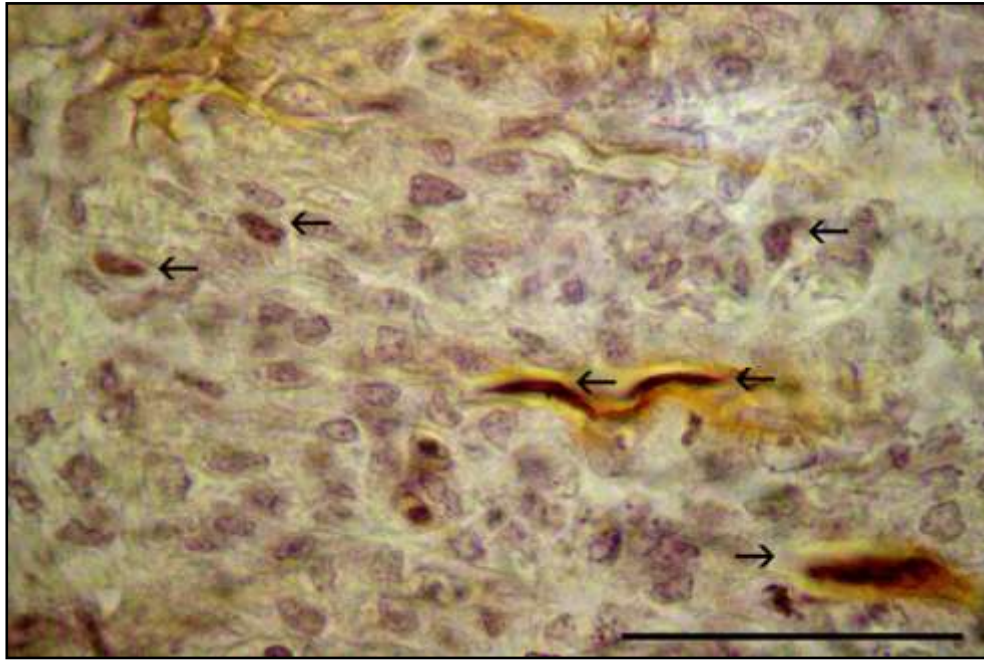


Figura 46. Fotomicrografia da moela de embriões no estágio 44 (18 dias) com células IR nos espaços intercelulares na mucosa. Setas = Células IR. Barra = 50 μ m.

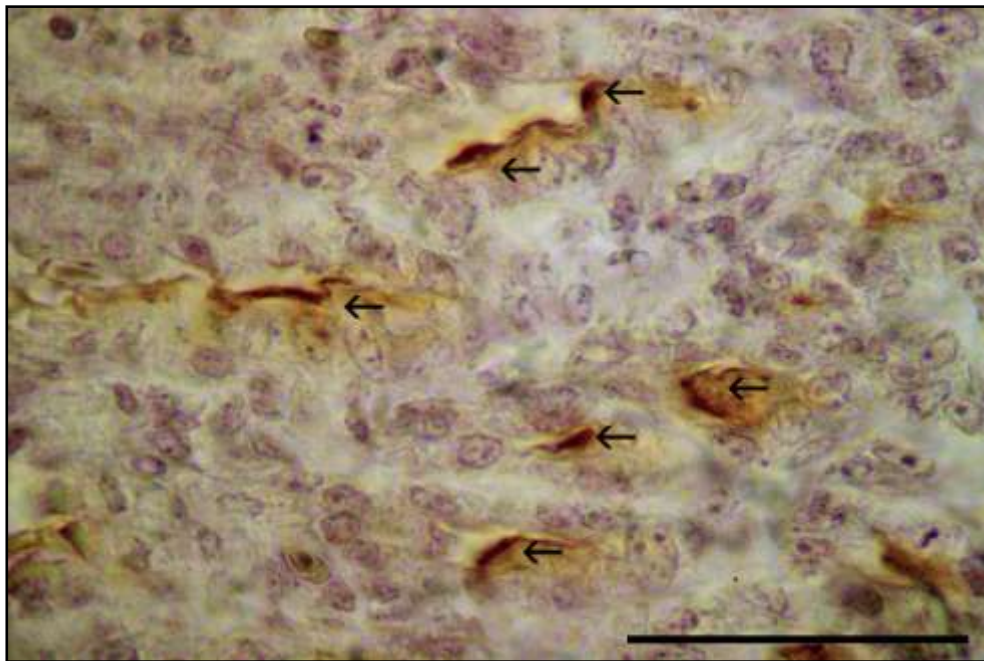


Figura 47. Fotomicrografia da moela de embriões no estágio 45 (19 dias) com células IR nos espaços intercelulares na mucosa. Setas= Células IR. Barra = 50 μ m.

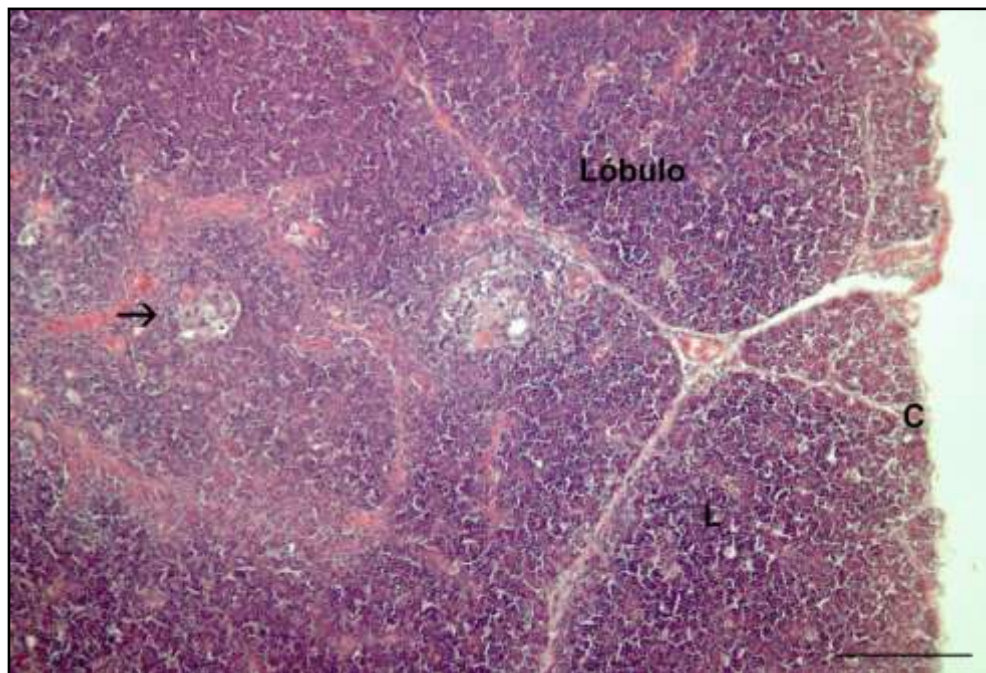


Figura 48. Fotomicrografia do controle timo de *G. gallus* (adulto) é recoberto por delgada cápsula de tecido conjuntivo (C) que invagina para interior do órgão formando septos, dividindo o órgão em lóbulos (L). Cada lóbulo apresenta uma região cortical e medular, nesta última encontram-se os corpúsculos tímicos. Coloração: HE. R. Cortical= região cortical, L = lóbulos; C = cápsula; (seta) = corpúsculo tímico. Corado com Hematoxilina e Eosina. Barra = 50µm.

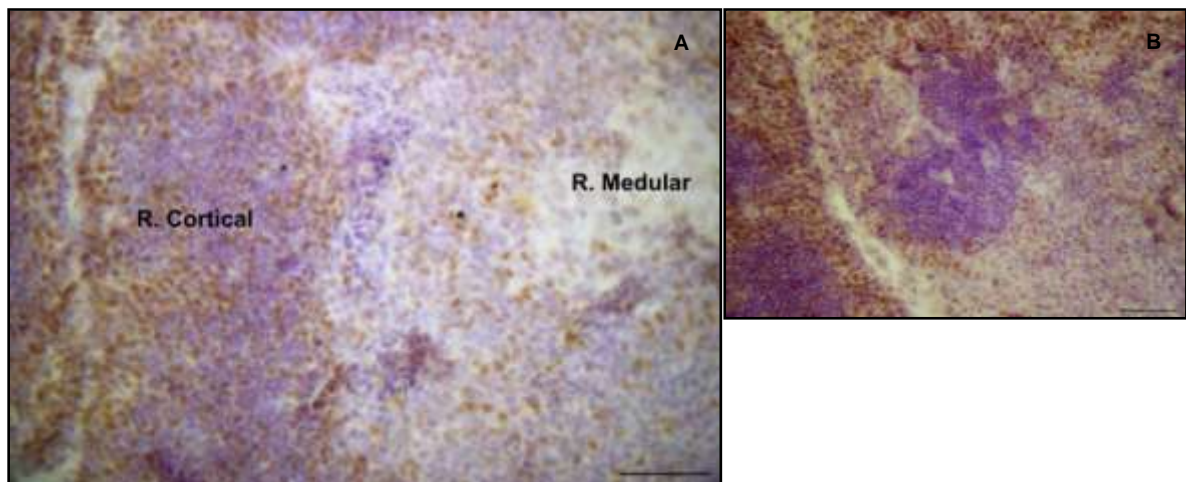


Figura 49. Fotomicrografia do timo de *G. gallus* (adulto). O controle positivo demonstrou células IR à p53 principalmente na região cortical (A e B). Núcleos dos linfócitos IR à p53. R. Cortical= região cortical, R. Medular = região medular. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50µm.

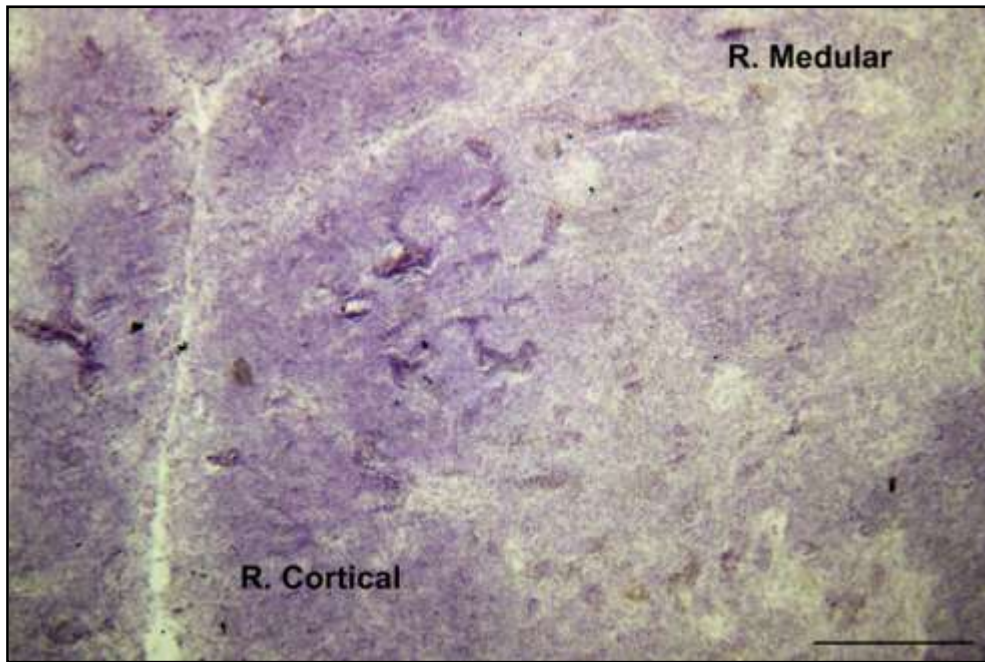


Figura 50. Fotomicrografias do timo de galinha. Controle negativo com ausência de células IR à p53. R. Cortical= região cortical, R. Medular = região medular. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 μ m.

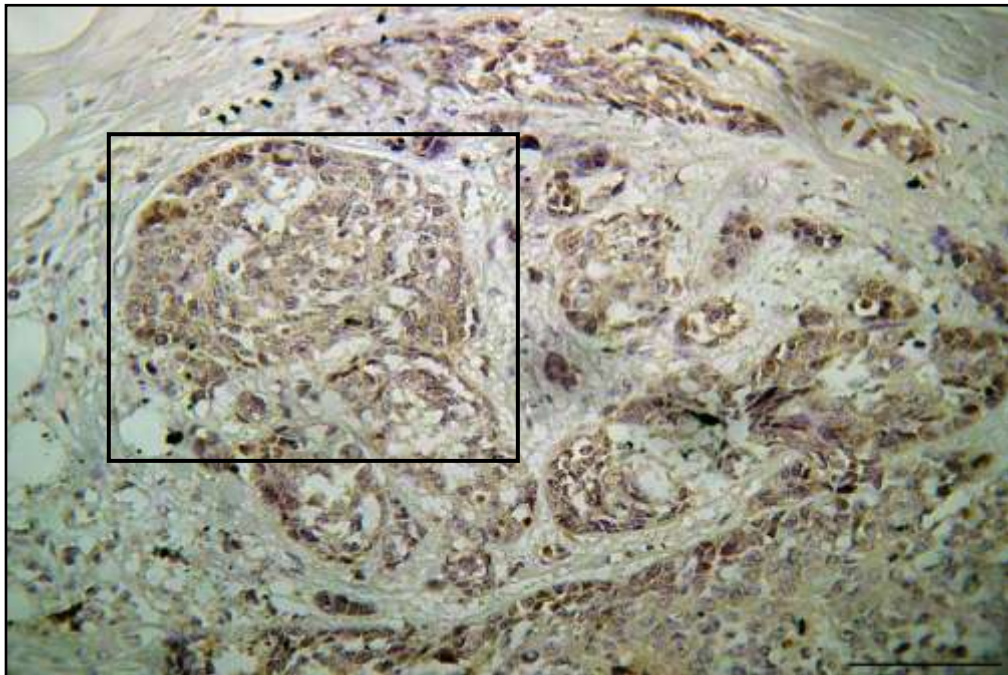


Figura 51. Fotomicrografia do tumor de mama humano. O controle positivo com células IR-p53. Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 100 μ m.

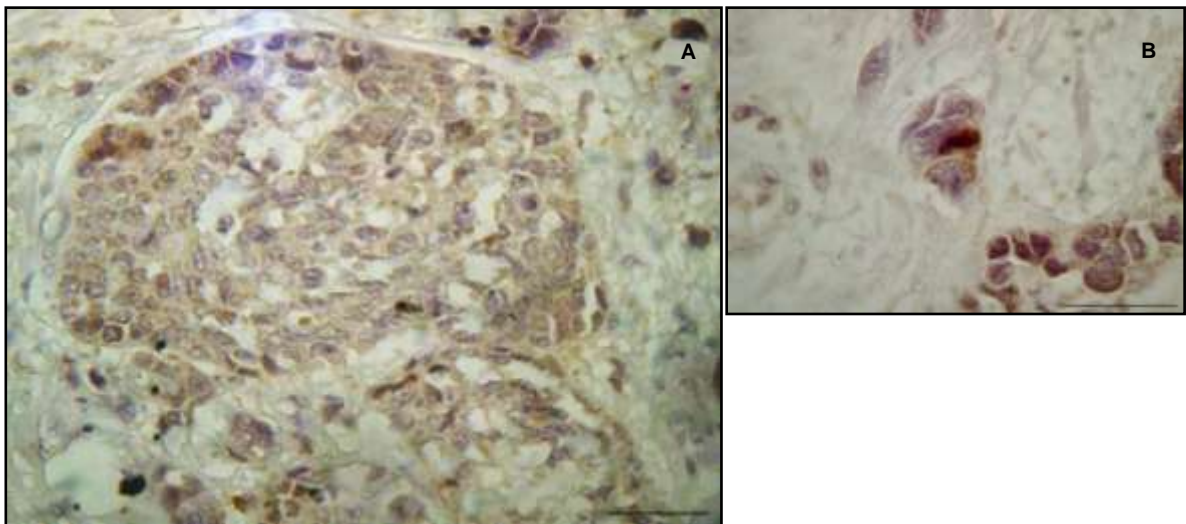


Figura 52. Fotomicrografia do tumor de mama humano em maior aumento (A) com célula IR-p53. Célula IR com núcleo corando em castanho (B). Contracorado com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 μ m.

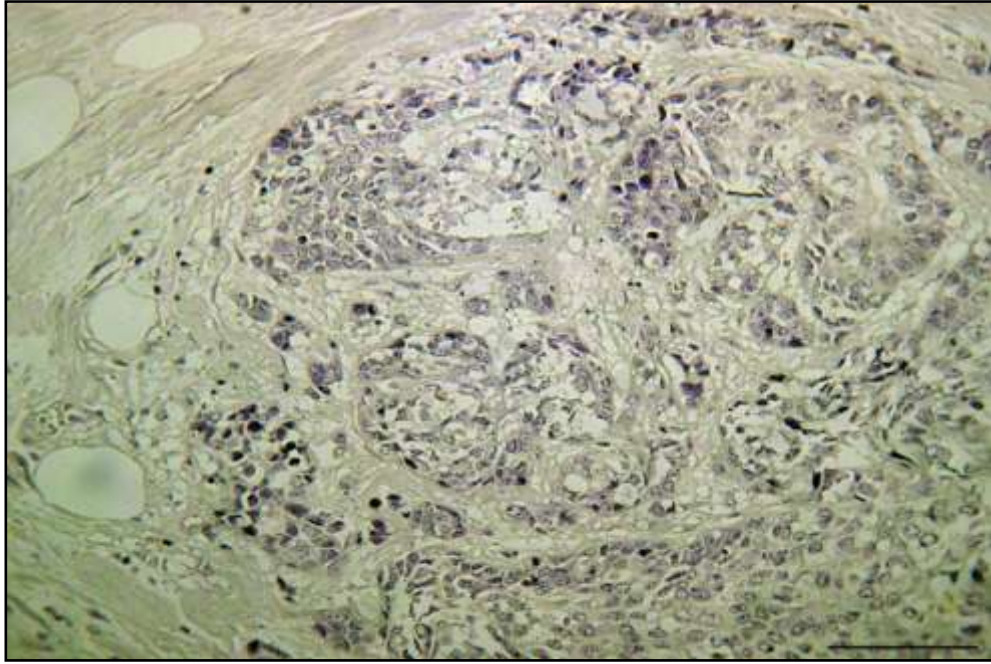


Figura 53. Fotomicrografia de cortes de tumor de mama humano. Controle negativo ausência de células IR-p53. Contracorados pela Hematoxilina de Harris. Barra = 100 μ m.

5. DISCUSSÃO

O embrião de *G. gallus* representa o modelo biológico ideal para a compreensão do desenvolvimento embrionário das aves (XU *et al.*, 2012), devido às características intrínsecas: rápido desenvolvimento, acessível, economicamente viável, funcionando como um sistema biológico que permite a investigação de genes e proteínas por meio de técnicas que podem testar a função destes no desenvolvimento (VERGARA E CANTO-SOLER, 2012).

O desenvolvimento do tubo digestivo dos embriões se inicia nos primeiros dias de incubação (SHIN; WATANIKI; YASUGI, 2005). Inicialmente, ele consiste em um tubo simples e indiferenciado (KLASING, 1999; SMITH *et al.*, 2000). O estômago do embrião de galinha começa a se diferenciar entre o terceiro e o quarto dias de desenvolvimento embrionário. No sexto dia, o proventrículo e a moela já se diferenciaram, adquirindo características anatômicas distintas (TONER, 1965; TAKIGUCHI; YASUGI; MIZUNO, 1988; ROBERTS *et al.*, 1998; FUKUDA & YASUGI, 2005).

A histogênese da mucosa do proventrículo e da moela de *G. gallus* foi estudada histológica e histoquimicamente por Pinheiro *et al.* (1989), Sgambati *et al.* (1995, 1996); ultraestruturalmente por Toner (1965; 1966); histológica e imuno-histoquimicamente por Takiguchi; Yasugi; Mizuno (1988), Aksoy & Cinar (2009). Esses estudos confirmam os achados histológicos sobre o desenvolvimento da mucosa gástrica, sendo escassos os relatos sobre o desenvolvimento do esôfago na literatura.

A morfogênese da mucosa gastroesofágica demonstra a expressão da proteína p53, principalmente nos estádios em que houve intensa remodelação tecidual. As células IR à p53 no epitélio esofágico ocorrem principalmente na superfície e raramente em células basais. As glândulas esofágicas apresentaram células IR à p53 nos estádios finais do desenvolvimento (43 a 45), 17 a 20 dias do desenvolvimento. A glândula esofágica foi considerada como uma estrutura primordial até o estágio 44 (18 dias), pois somente após o estágio 45 as glândulas adquirem a forma de glândula mucosa. Entre os estádios 43 a 45 (18 a 20 dias), a glândula esofágica sofre remodelação para ganhar a morfologia de glândula mucosa, célula com citoplasma claro e núcleos periféricos na região basal. As células IR apresentam, em geral, o núcleo picnótico, característicos de células em apoptose. Na glândula esofágica, as células IR com características de apoptose foram, provavelmente, descartadas para completar a morfogênese da glândula. No entanto, no epitélio de revestimento, essas células indicam que a mucosa se apresenta em constante renovação desde a fase embrionária.

No proventrículo, a expressão da proteína p53 ocorre principalmente na fase de remodelação e pós-remodelação do epitélio de revestimento. Na moela, a formação do primórdio da glândula tubular ocorre nos estádios 41 e 42 (15 e 16 dias) quando o epitélio de revestimento sofre intensa remodelação, momento no qual ocorre a expressão da proteína p53. As células IR apresentam-se nos espaços intercelulares, futuros ductos das glândulas tubulares. A expressão da proteína p53 na mucosa gastroesofágica pode ser notada em reação crescente em relação à formação do órgão. Ocorre principalmente nos estádios que iniciam a remodelação tecidual e acompanham a diferenciação dessas células até formar as estruturas glandulares com as características semelhantes às observadas no animal adulto.

A p53 foi descrita em embriões de *G. gallus* (KRINKA *et al.*, 2001; RINON *et al.*, 2011), sua expressão ocorre durante a formação da linha primitiva, em gradiente crescente durante a gastrulação; durante neurogênese, na diferenciação do neuroectoderma; e em fase inicial da cardiogênese (KRINKA *et al.*, 2001). Relatada no tubo neural e em células progenitoras da crista neural cranial (CNC) por RINON *et al.* (2011), este constatou a p53

durante a formação do tubo neural e que é necessário a redução dos níveis desta proteína para permitir a migração celular da CNC e, propondo, portanto que a p53 funcione como regulador negativo da diferenciação nestas células. Em embriões de camundongos, a p53 foi descrita durante a diferenciação de vários tipos celulares, como mioblastos, queratinócitos, oligodendrócitos, tireócitos; durante a osteogênese atenua os osteoblastos; na miogênese esquelética participa da diferenciação dos mioblastos; promove controle negativo, atenuando a adipogênese (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Entretanto, apesar da p53 estar presente no desenvolvimento de camundongos, estes podem se desenvolver normalmente na deficiência desta. Porém, durante a vida pós-natal, a deficiência na expressão de p53 predispõe o animal a desenvolver inúmeros processos neoplásicos (WALLINGFORD *et al.*, 1997). Em anfíbios como *Xenopus laevis*, o gene *p53* é o único responsável pela diferenciação do mesoderma, comprometendo todo o processo de gastrulação, levando o embrião à morte (WALLINGFORD *et al.*, 1997; MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Em zebrafish, a p53 foi descrita durante a neurogênese e no desenvolvimento do trato intestinal (MOLCHADSKY *et al.*, 2008). Nesses estudos foi sugerida uma função versátil para a p53, pois durante a diferenciação celular, ora ela pode estimular a diferenciação, como por exemplo, no caso do músculo esquelético, ora pode inibir, tal como a osteogênese e a adipogênese.

A p53 participa da ontogênese nas diferentes classes de vertebrados (mamíferos, aves, peixes e anfíbios) e sua função pode ser dependente do contexto fisiológico, da fase do desenvolvimento e ser específica da célula-alvo, desta forma, sugere que a p53 também atue como um regulador celular da diferenciação tecidual (MOLCHADSKY *et al.*, 2008).

Como os eventos da ontogênese e apoptose são altamente ligados e sendo a p53 um importante regulador de apoptose, o que a torna um importante alvo de estudos, é provável que uma deficiência na função desta possa resultar no comprometimento do desenvolvimento (RINON *et al.*, 2011). Assim, estudos sobre a p53 durante o desenvolvimento tornam-se essenciais para o entendimento dos eventos morfogênicos normais e patológicos.

6. CONCLUSÃO

✓ A expressão da proteína p53 na mucosa gastroesofágica foi crescente em relação à formação destes órgãos, mostrando-se nos estádios de remodelação dos órgãos, seguindo até a formação de estruturas com características morfológicas destes órgãos presente no animal adulto.

✓ Presente em momentos marcantes da diferenciação da mucosa gastroesofágica, a p53 é expressa no esôfago (durante a remodelação das células para formar as glândulas esofágicas, nos estádios 42-45), no proventrículo (quando o epitélio da mucosa se diferencia, nos estádios 39-45) e na moela (durante a formação das glândulas tubulares, nos estádios 41-45).

✓ No entanto, apesar de participar da morfogênese destas estruturas, não há como afirmar que sua expressão seja essencial para o desenvolvimento, pois o presente estudo não analisou a forma desativada ou bloqueada do gene ou da proteína p53 em embriões de galinha, impedindo, portanto, sua atividade na célula o que poderia levar ou não a alterações no desenvolvimento da mucosa gastroesofágica.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKSOY, A.; CINAR, K. Distribution and ontogeny of gastrin- and serotonin-immunoreactive cells in the proventriculus of developing chick, *Gallus gallus domestica*. **Journal of Veterinary Science**, v.10, n.1, p. 9-13, 2009.

ALMOG, N.; ROTTER, V. Involvement of p53 in cell differentiation and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1333, n. 1, p. F1-27, 1997.

BAI, L.; ZHU, W. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. **Journal Cancer Molecular**, v. 2, n. 4, p. 141-153, 2006.

CHÈNE, P. Inhibiting the p53-mdm2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nature**, v. 3, n. February, p. 102-109, 2003.

CHIPUK, J. E.; KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; DROIN, N. M.; NEWMAYER, D. D.; SCHULER, M.; GREEN, D. R. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1010-1014, 2004.

CRAWFORD, L. V.; PIM, D. C.; BULBROOK, R. D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 30, p. 403-408, 1982 apud SOUSSI, T.; MAY, 1986, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 5, p. 623-37, 1996.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219.

DELEO, A.B.; JAY, G.; APPELLA, E., DUBOIS, G. C.; LAW, L.W., OLD, L.J. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 2420-2424, 1979 apud BAI, L.; ZHU, W., 2006. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. **Journal Cancer Molecular**, v. 2, n. 4, p. 141-153, 2006.

ENTEZARI, M.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Apoptosis in Developmental Processes. **eLS**, 2010.

FADOK, V., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L., HENSON, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 5, n. 7, p. 551-62, 1998.

FUKUDA, K.; YASUGI, S. The molecular mechanisms of stomach development in vertebrates. **Development, growth e differentiation**, v. 47, n. 6, p. 375-382, 2005.

GLUCKSMAN, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Review*, v. 26, p. 59-86, 1951 apud JACOBSON M. D.; WEIL M.; RAFF M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

HENGARTNER, M. O. Genetic control of programmed cell death and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, v. 32, n. 4-5, p. 363-74, 1997.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJSTED, M. *Embriologia Veterinária*. 1^a ed., Elsevier, 383 p., 2012.

HU, WU; FENG, Z.; ATWAL, G. S.; LEVINE, A. J. p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*, v. 7, p. 848-852, 2008.

JACOBSON M. D., WEIL M., RAFF M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

JOZA N.; KROEMER G.; PENNINGER J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends in Genetics*, v. 18, n. 3, p. 142-149, 2002.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, v. 182, p. 471-474, 2002.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KLASING, K. C. Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 8, n. 2, p. 42-50, 1999.

KRINKA, D.; RAID, R.; PATA, I.; KÄRNER, J.; MAIMETS, T. In situ hybridisation of chick embryos with p53-specific probe and their immunostaining with anti-p53 antibodies. *Anatomy and embryology*, v. 204, n. 3, p. 207-15, 2001.

LANE, D. P. p53, guardian of the genome. *Nature*, v. 358, p. 15-16, 1992.

LANE, D. P.; BENCHIMOL, S. P53: Oncogene or Anti-Oncogene? *Genes & Development*, v. 4, n. 1, p. 1-8, 1990.

LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P. W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poultry science*, v. 86, n. 12, p. 2685-2691, 2007.

LEVINE, A. J.; FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; DRIVE, M.; CAROLINA, N. P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell*, v. 116, n. 2, p. S67-69, 2004.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, v. 351, p. 453-456, 1991.

- LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749-58, 2009.
- LU, W.-J.; AMATRUDA, J. F.; ABRAMS, J. M. P53 Ancestry: Gazing Through an Evolutionary Lens. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 758-62, 2009.
- MEIER, P., FINCH, A, EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.
- MOLCHADSKY, A.; RIVLIN, N.; BROSH, R.; ROTTER, V.; SARIG, R. P53 Is Balancing Development, Differentiation and De-Differentiation To Assure Cancer Prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1501-8, 2010.
- MOLCHADSKY, A.; SHATS, I.; GOLDFINGER, N.; PEVSNER-FISCHER, M.; OLSON, M.; RINON, A.; TZAHOR, E., LOZANO, G.; ZIPORI, D.; SARIG, R.; ROTTER, V. P53 Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a Cell Fate Dependent Manner. **PloS one**, v. 3, n. 11, p. e3707, 2008.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The fas death factor. **Science**, v. 267, p. 1449-1456, 1995.
- PINHEIRO, N. L.; GEORGE, L. L.; MOTA, D. L. Histogenesis and histochemistry of the secretion plate: detection of glycans and neutral glycoproteins synthesized by epithelial components of the gizzard mucosa of *Gallus gallus*. **Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch**, v.135, n. 3, p. 385-395, 1989.
- PINTUS, S. S., FOMIN, E. S., OSHURKOV, I. S., IVANISENKO, V. A. Phylogenetic analysis of the p53 and p63/p73 gene families. **In Silico Biology**, v. 7, n. 3, p. 319-32, 2007.
- RINON, A.; MOLCHADSKY, A.; NATHAN, E.; YOVEL, G.; ROTTER, V.; SARIG, R.; TZAHOR, E. p53 coordinates cranial neural crest cell growth and epithelial-mesenchymal transition / delamination processes. **Development**, v. 138, p. 1827–1838, 2011.
- ROBERTS, D. J.; SMITH, D. M.; GOFF, D. J.; TABIN, C. J. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. **Development** (Cambridge, England), v. 125, n. 15, p. 2791-801, 1998.
- ROUCOU, X.; ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. Involvement of mitochondria in apoptosis. **Cardiology clinics**, v. 19, n. 1, p. 45-55, 2001.
- SAUNDERS, J. W. Death in embryonic systems. **Science**, v. 154, n. 3749, p. 604-12, 1966.
- SAVILL, J., FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, (407):784-788, 2000.
- SGAMBATI E.; BRYK, S. G.; GHERI, G. Histochemical study of the epithelial mucins in the gizzard of the chick embryo. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 101, n. 3, p. 173-185, 1996.

- SGAMBATI, E., BRYK, S. G., GHERI, G. Histochemical characterization of the mucins of the epithelial cells in the chick embryo proventriculus. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 100, n. p. 83-97, 1995.
- SHIN, M.; WATANUKI, K.; YASUGI, S. Expression of Fgf10 and Fgf receptors during development of the embryonic chicken stomach. **Gene expression patterns: GEP**, v. 5, n. 4, p. 511-516, 2005.
- SOUSSI, T.; MAY, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 5, p. 623-37, 1996.
- STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis, *Nature Review Cancer*, v. 7, p. 165–168, 2007.
- TAKIGUCHI, K.; YASUGI, S.; MIZUNO, T. Developmental changes in the ability to express embryonic pepsinogen in stomach epithelia of chick embryos. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 56-62, 1988.
- TONER, P. G. Development of the acid secretory potential in the chick embryo proventriculus. **Journal Anatomy**, v. 99, n. 2, p 389-398, 1965.
- TORNER, P. G. Ultrastructure of the developing gizzard epithelium in the chick embryo. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 73, n. 2, p. 220-233, 1966.
- VAUX, D. L. Apoptosis Timeline. **Cell Death and Differentiation**, v.9, n. 4, p. 349-354, 2002.
- VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural development**, v. 7, n. 1, p. 22, 2012.
- VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature**, v. 2, p 594-604, 2002.
- WADE, M., WANG, Y. V., WAHL, G. M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 299-309, 2010.
- WALLINGFORD, J. B.; SEUFERT, D. W.; VIRTÀ V. C.; VIZE, P. D. (1997). p53 activity is essential for normal development in *Xenopus*. **Current Biology**, v. 7, n. 10, p. 747-757, 1997.
- WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 95-118, 2009.
- WANG, X.; JIANG, X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS letters*, v. 586, n. 10, p. 1390–1396, 2012.
- WYLLIE, A. H. “Where, O Death, Is Thy Sting?” A Brief Review of Apoptosis. **Molecular Neurobiology**, v. 42, p. 4-9, 2010.

WYLLIE, A. H. Death in normal and neoplastic cells. **Journal Clinical Pathology**, v. 7, p. 35-42, 1974.

XU, J.; DELPROPOSTO, Z.; ZHOU, Z.; SHEN, H.; XUAN, S. Y.; LI, Q. H.; HAACKE, E. M.; HU, J. In ovo monitoring of smooth muscle fiber development in the chick embryo: diffusion tensor imaging with histologic correlation. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e34009, 2012.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Cell Death: History and Future. Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, n. 1-11, 2007.

ZIEGLER, U.; GROUSCURT, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-28, 2004.

ANEXOS

A. Parecer da Comissão de Ética



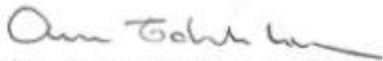
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 189/2011

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Avaliação da relação entre a proteína pró-apoptótica p53 e a diferenciação celular na morfogênese da moela em Gallus gallus domesticus (Linnaeus, 1758)*” sob a responsabilidade da Profa. Dra. Nadja Lima Pinheiro do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia, processo 23011792/2011-31, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 14/03/2012.


Profa. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação

B. Anticorpo primário anti-p53



Mouse (monoclonal) Anti-p53 Protein Unconjugated

PRODUCT ANALYSIS SHEET

Catalog Number:	AHO0112
Lot Number:	See product label
Quantity/Volume:	100 µg/0.5 mL
Clone Number:	PAb 240
Isotype:	IgG1 (mouse)
Form of Antibody:	Purified immunoglobulin in phosphate buffered saline, pH 7.4, with 0.2% bovine serum albumin.
Preservation:	0.09% sodium azide (Caution: sodium azide is a poisonous and hazardous substance. Handle with care and dispose of properly.)
Purification:	Purified from ascites by Protein G chromatography.
Immunogen:	Murine p53-β-galactosidase fusion protein containing p53 sequence from amino acid 14-289.
Specificity:	This monoclonal antibody recognizes a protein of 53 kDa which is identified as the product of p53 tumor suppressor gene. It reacts with only certain mutant p53 protein under non-denaturing condition in immunoprecipitation but reacts with both mutant and wild form of p53 under denaturing condition in Western blotting. Its epitope maps within the middle region (aa 212-217) of p53. In frozen node-negative breast cancers, immunohistochemical staining with a cocktail of Pab240/1801 was reported to be most strongly associated with overall survival compared with either antibody alone or with other antibodies directed toward p53.
Species Reactivity:	Human, mouse, rat, hamster, monkey, cow, pig, and chicken . Other species were not determined.
Applications:	This antibody is suitable for use in flow cytometry, immunoprecipitation, Western blotting and immunohistochemistry with cryostat, methacarn-fixed/paraffin embedded, or formalin-fixed/paraffin embedded tissue sections. Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 1 mM EDTA, pH 8, for 10-20 minutes followed by cooling at room temperature for 20 minutes.
Suggested Working Dilutions:	For immunoprecipitation use 10 µL/mg of cell lysate, for Western blotting use 1:200-1:400 dilution, and for immunohistology 1:50-1:100 is recommended. The optimal antibody concentration should be determined for each specific application.
Recommended Positive Control:	CEM human leukemia cells for Western blotting. For immunohistochemistry, about 50% of human breast carcinomas are p53 positive, especially those lacking estrogen and/or progesterone receptor, or with high proliferation index.
Storage:	Store at 2-8°C. For long term storage, aliquot into small volumes and store at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles to avoid denaturing the antibody.

This product is for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Carlsbad • CA 92012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: inquiry@invitrogen.com

PI AHO0112

(Rev 10/08) DCC-08-1089

Important Licensing Information - These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or our website, www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses. Unless otherwise indicated, these products are for research use only and are not intended for human or animal diagnostic, therapeutic or commercial use.

C. Diluente

ADS-XXXXUO
Rev B
Page 1 of 1



Antibody Diluent

	Catalog #
	ADS-125
Size	125 ml

INTENDED USE:	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
DESCRIPTION:	Antibody diluent is prepared for use in immunochemical procedures. Antibodies can be diluted directly in this reagent.
APPLICATIONS:	Immunohistochemistry (IHC)
CONTENTS:	Tris buffer, pH 7.6 with 1% BSA and less than 0.1% sodium azide
STORAGE & STABILITY	Store at 2-8°C. Do not freeze. The user must validate any other storage conditions. This reagent must be returned to the storage conditions identified above immediately after use. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use the reagent beyond the expiration date. If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the reagent is suspected, contact Technical Support at tech@springbio.com .
WARNINGS & PRECAUTIONS:	<ol style="list-style-type: none">1. Take reasonable precautions when handling reagents. Wear appropriate Personal Protective Equipment.2. Avoid contact of reagents with eyes, mucous membranes and skin. If reagents come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.3. Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.4. Avoid microbial contamination of reagents.

D. Kit ABC



VECTASTAIN® UNIVERSAL

(Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG)

Elite
ABC KIT
Cat. No. PK-6200

INSTRUCTIONS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING

INTRODUCTION

The VECTASTAIN® ABC system is widely accepted as one of the most sensitive, economical and reliable immunoperoxidase systems available. For several years our efforts were devoted to improving the original ABC system. This research led to the development of the VECTASTAIN® Elite ABC Kit, which is considerably more sensitive than the original VECTASTAIN® ABC peroxidase system without increased background staining. This enhanced sensitivity is particularly important in the localization of antigens present in low amounts or in cases where the cost of primary antibodies is significant. The increased sensitivity also provides an option to substantially reduce staining times. The VECTASTAIN® Elite ABC Kit is based on the same patented principles as the other VECTASTAIN® ABC Kits outlined below.

Avidin is a 68,000 molecular weight glycoprotein with an extraordinarily high affinity ($10^{14}M^{-1}$) for the small molecular weight vitamin, biotin. Because this affinity is over one million times higher than that of antibody for most antigens, the binding of avidin to biotin (unless antibody-antigen interaction) is essentially irreversible. In addition to this high affinity, the Biotin/Avidin System can be effectively exploited because avidin has four binding sites for biotin and most proteins (including antibodies and enzymes) can be conjugated with several molecules of biotin. These aspects provide the potential for macromolecular complexes to be formed between avidin and biotinylated enzymes.

An immunoperoxidase procedure based on these properties was devised for localizing a variety of histologically significant antigens and other markers. (Hsu SM, Raine L, Fanger H: *Am. J. Clin. Pathol.* 73, 734-738, 1981; Hsu SM, Raine L, Fanger H: *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580, 1981.) This technique employs unlabeled primary antibody, followed by biotinylated secondary antibody and then a peroxidase Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex. This has been termed the ABC technique.

VECTASTAIN® Elite ABC Kits contain Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H reagents, which have been specially prepared to form ideal complexes for immunoperoxidase staining. Although the structure of the Avidin DH: biotinylated horseradish peroxidase H complex is still undefined, evidence suggests that it consists of many biotinylated horseradish peroxidase molecules crosslinked by avidin into a three dimensional array. The complex apparently has few exposed biotin residues but retains at least one biotin binding site. Formation of the complex is achieved by mixing Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H in dilute solution and in defined amounts prior to use. After the initial incubation there appears to be little change in the complex as judged by only a marginal increase in immunoperoxidase staining sensitivity. The complex remains stable for several hours after formation. For long term stability, we recommend using the R.T.U. VECTASTAIN® Elite ABC products. The Elite is 5 times more sensitive than the original ABC kit.

Vector Laboratories, Inc. • 30 Ingot Road • Burlingame, CA 94010 USA
Tel: (650) 697-3600 • Fax: (650) 697-0339
Email: vector@vectorlabs.com
Website: <http://www.vectorlabs.com>

PREPARATION OF VECTASTAIN® WORKING SOLUTIONS

For convenience, VECTASTAIN® Elite ABC Kits include mixing bottles to prepare working solutions of reagents. As supplied, the drop dispenser tip is in an inverted position and is not inserted into the bottle. After the buffer and appropriate reagents are added to the bottle, insert the drop dispenser tip into the white or gray opaque cap in correct orientation. Place the entire unit onto the bottle and twist on the cap. As the cap is tightened, the drop dispenser will snap into place. To remove the drop dispenser tip for refilling, merely press laterally with thumb until the tip snaps off. When dispensing drops, hold the bottle in an inverted vertical position and squeeze gently. To prevent evaporation, secure the opaque white or gray caps on the bottles when they are not in use.

When using dropper bottles to dispense reagents, apply a sufficient number of drops on the slide to cover the entire section. Slides should then be placed in a humidified chamber during the incubation period. Staining dishes or Coplin jars may also be used in the staining procedure. To make up these working solutions, use the same drop/volume ratio as recommended in the instructions for preparation of dropper bottle reagents but increase the amounts as desired.

A number of different buffers can be used in the VECTASTAIN® Elite ABC system. One of the most common is 10 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.9% saline (PBS). The VECTASTAIN® working solutions are prepared as follows:

- Blocking Serum (Normal Horse Serum): add one (1) drop (50 µl) of stock (yellow label) to 5 ml of buffer in mixing bottle (yellow label). The preferred serum for blocking is prepared from the same species in which the biotinylated secondary antibody is made.
- Biotinylated Universal (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) Antibody: add two (2) drops (100 µl) of normal blocking serum stock (yellow label) to 5 ml buffer in mixing bottle and then add two (2) drops (100 µl) of biotinylated antibody stock (blue label).
- VECTASTAIN® Elite ABC Reagent: add exactly two (2) drops of REAGENT A (gray label) to 5 ml of buffer in the ABC Reagent large mixing bottle. Then add exactly two (2) drops of REAGENT B (gray label) to the same mixing bottle, mix immediately, and allow VECTASTAIN® Elite ABC Reagent to stand for about 30 minutes before use.

ENZYME SUBSTRATES

A variety of chromogens can be used to localize peroxidase in tissue sections. Vector Laboratories offers the traditional substrates DAB and AEC as well as several proprietary substrates, producing colors as listed below:

ImmPACT® DAB, SK-4105, brown
ImmPACT® AEC*, SK-4205, red
ImmPACT® VIP, SK-4605, purple
ImmPACT® SG, SK-4705, blue/gray
ImmPACT® NovaRED®, SK-4805, red
Diaminobenzidine (DAB), SK-4100, brown
DAB + H², SK-4100, gray/black
3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)*, SK-4200, red
TMB, SK-4400, blue
Vector® VIP, SK-4600, purple
Vector® SG, SK-4700, blue-gray
Vector® NovaRED®, SK-4800, red

* AEC is soluble in alcohol and clearing agents and must be mounted in aqueous mounting media. All other substrates are not soluble in alcohol or clearing agents. They may be dehydrated, cleared, and permanently mounted.

These substrates can be used as single labels or to introduce multiple colors in a tissue section.

STAINING PROCEDURE FOR PARAFFIN SECTIONS

1. Deparaffinize and hydrate tissue sections through xylenes or other clearing agents and graded alcohol series.
2. Rinse for 5 minutes in tap water.*
3. If quenching of endogenous peroxidase activity is required, incubate the sections for 30 minutes in 0.3% H₂O₂ in either methanol or water. Incubation times may be shortened by using higher concentrations of H₂O₂. If endogenous peroxidase activity does not present a problem, step 3 may be omitted.
4. Wash in buffer for 5 minutes.

5. Incubate sections for 20 minutes with diluted normal blocking serum which was prepared from the species in which the secondary antibody is made. (In cases where non-specific staining is not a problem, Steps 5 and 6 may be omitted).
6. Elot excess serum from sections.
7. Incubate sections for 30 minutes with primary antiserum diluted in buffer.
8. Wash slides for 5 minutes in buffer.
9. Incubate sections for 30 minutes with diluted biotinylated secondary antibody solution.
10. Wash slides for 5 minutes in buffer.
11. Incubate sections for 30 minutes with VECTASTAIN® *ABC* Reagent.
12. Wash slides for 5 minutes in buffer.
13. Incubate sections in peroxidase substrate solution until desired stain intensity develops (see Note 2).
14. Rinse sections in tap water.
15. Counterstain, clear and mount.

* If antigen unmasking is required, perform this procedure after step 2, using Cat. No. H-3300 (citrate-based) or H-3301 (High pH).

If unwanted staining occurs in the absence of biotinylated secondary antibody, endogenous protein-associated biotin may be present in the tissue. To eliminate this unwanted staining, use an Avidin/Biotin blocking step (Cat. No. SP-2001) between steps 4 and 5.

STAINING PROCEDURE FOR FROZEN SECTIONS

This procedure is generally appropriate for frozen sections, cell smears or cytocentrifuge preparations.

1. Sections are air dried.
2. Immediately before staining, fix sections with acetone or the appropriate fixative for the antigen under study.
3. Transfer slides into buffer.
4. If quenching of endogenous peroxidase is required, use gentle H₂O₂ blocking to reduce the risk of antigen destruction or tissue loss: 0.3% H₂O₂ in 0.3% Normal Sera in PBS for 5 minutes; or 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes, or use other published methods (e.g. Andrew, S. M., Jassani, B., *Histochem J.* 1987, **19**, 426-430). If necessary, H₂O₂ treatment may also be performed after the biotinylated secondary antibody step.
5. Follow steps 4-15 of the procedure recommended for paraffin sections.

MULTIPLE ANTIGEN LABELING ON SAME TISSUE SECTION

For photomicrographic examples of substrates, counterstains, and general protocols, please refer to our website or request a free brochure on multiple labeling - "Discovery through color".

RAPID STAINING PROCEDURE

The sensitivity of the VECTASTAIN® *ABC* Kit permits development of shortened immunoperoxidase staining protocols. In this section some guidelines are provided for a rapid staining method having a sensitivity and staining quality equivalent to the full-length VECTASTAIN® *ABC* protocol.

1. Prepare paraffin-embedded or frozen sections for staining as described elsewhere. Prepare VECTASTAIN® *ABC* Kit reagents as follows: For the Biotinylated Antibody, add two drops concentrated stock to 2.5 ml of PBS containing two drops normal serum. If background staining is a problem, increase the concentration of normal serum up to 10%. For the VECTASTAIN® *ABC* Reagent, add two drops of Reagent A to 2.5 ml buffer, mix, then add two drops of Reagent B. Mix and allow to stand for 5-30 minutes before use.
2. If quenching of endogenous peroxidase is required, an accelerated quenching procedure can be employed. Treat sections with 3% hydrogen peroxide in water for 3-5 minutes.

3. Wash gently with a stream of buffer from a wash bottle.
4. If background staining is a problem, incubate sections for 5-10 minutes in 2% - 10% normal serum in buffer.
5. Incubate sections with primary antibody.*
6. Wash as in step 3.
7. Incubate sections for 10 minutes with diluted biotinylated secondary antibody.
8. Wash as in step 3.
9. Incubate sections for 5 minutes with VECTASTAIN® *ABC* Reagent.
10. Wash as in step 3.
11. Incubate sections in peroxidase substrate solution until desired stain intensity develops (see Note 2).
12. Wash as in step 3.
13. Counterstain, clear and mount.

*The concentration, staining time and temperature of the primary antibody should be tailored to an investigator's particular requirements. The increased sensitivity of the VECTASTAIN® *ABC* Kit allows shorter primary antibody incubation times. For example, at primary antibody concentrations optimal for the regular VECTASTAIN® *ABC* Kit, incubation times can be reduced at least in half when using the VECTASTAIN® *ABC* Kit. Higher concentrations of primary antibody allow even shorter incubation times.

NOTE: A very rapid procedure that provides excellent staining results can also be performed. Prepare diluted biotinylated secondary antibody 4 drops to 2.5 ml plus 2 drops normal serum. Prepare VECTASTAIN® *ABC* Reagent as in the above protocol. Apply diluted VECTASTAIN® *ABC* Kit reagents preheated to 37 °C. Incubate sections in each reagent for 2 minutes.

A VECTASTAIN® Universal Quick Kit (Cat. No. PK-8800), based on a pre-formed streptavidin/peroxidase complex, is also available to perform rapid immunohistochemical staining.

NOTES:

1. Solutions containing sodium azide or other inhibitors of peroxidase activity should not be used in diluting the peroxidase substrate or the VECTASTAIN® *ABC* Reagent. Do not add normal serum, non-fat dried milk, culture media or other potential sources of biotin to the *ABC* reagent. This may result in reduced sensitivity.
2. Development times may differ depending upon the level of antigen, the intensity of the stain that is required, or the substrate used: ImmPACT® DAB and DAB generally should be developed for 2-10 minutes; ImmPACT® VIP and Vector® VIP for 2-15 minutes; ImmPACT® SG and Vector® SG for 2-10 minutes; ImmPACT® NovaRED® and Vector® NovaRED® for 2-15 minutes; ImmPACT® AEC and AEC for 10-30 minutes; TMB for 5-20 minutes. Some counterstains may not be compatible with certain peroxidase substrates because of solubility of the reaction products or lack of color contrast. A counterstain compatibility chart is available upon request. Refer to the instructions in the respective substrate kits for further details.
3. In the presence of nickel ions, the precipitate formed by DAB is gray/black rather than brown. This may enhance the sensitivity of the staining procedure and, because of the difference in color from DAB alone, has been used in double-labeling techniques. The DAB Substrate Kit (Cat. No. SK-4100) contains nickel chloride and allows two colors to be introduced into the section.
4. If the reagents are to be diluted beyond their recommended concentrations, first prepare the diluted biotinylated antibody and VECTASTAIN® *ABC* reagent as described in the instructions. Subsequent dilutions should be made in a buffer containing 0.1% immunohistochemical grade bovine serum albumin (Cat. No. SP-5050). Only immunohistochemical grade BSA should be used, as other preparations can contain undesired impurities. Dilution of these reagents may require longer incubation times and/or higher incubation temperatures to achieve maximum sensitivities.
5. The section should be well prepared. Fixation (generally, in buffered formalin not exceeding 4 percent formaldehyde) should be sufficient to maintain the integrity of the section throughout the staining procedure but not so harsh as to destroy the antigen under study. During the staining procedure, do not allow the section to dry out. Use a humidified chamber for incubations. In some cases, use of Antigen Unmasking Solution (Cat. No. H-3300 or H-3301) and exposure to high temperatures can overcome loss of antigens due to fixation.

6. To avoid adsorption of the antibody to the plastic or glass container in which the final dilution is made, the primary antibody may be diluted in buffers containing 0.1% immunohistochemical grade bovine serum albumin or dilute Blocking Serum.
7. Use only freshly prepared buffers. Bacterial contamination which can occur in buffers stored at room temperature may affect the quality of the staining. It is recommended that the VECTASTAIN[®] ABC Reagent and substrate solution be prepared with glass distilled water. Deionized water (even with low conductivity) may contain inhibitors of peroxidase and can reduce sensitivity.
8. Stock VECTASTAIN[®] ABC Kit reagents should be stored under refrigeration. For best results, the VECTASTAIN[®] ABC Kit reagents should be used before the date shown on the bottom of the box. The A and B reagents in the kits are matched. Do not use an A reagent from one kit with a B reagent from another kit. We recommend that they be kept in the box in which they were supplied. If reagents are removed from the box please note on them the date shown on the bottom of the box so that specific lots of reagents can be traced.
9. Although the affinity-purified biotinylated secondary antibody and the normal serum provided in VECTASTAIN[®] ABC Kits can be purchased individually, the Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase H are prepared especially for the VECTASTAIN[®] ABC Kits and are matched reagents. Do not confuse these with Cat. Nos. A-2000 and B-2004. We recommend using only ABC reagents provided in the VECTASTAIN[®] ABC kits. The universal (anti-mouse IgG/rabbit IgG) biotinylated antibody in this kit is prepared in horse specifically for this VECTASTAIN[®] Universal ABC Kit. This antibody should not be confused with other biotinylated antibodies sold as part of other kits.
10. Sections of neuronal tissue or sections which are thicker than normal may require longer incubation times for optimal staining.
11. Specimens should not be embedded in paraffin heated higher than 60 °C. Too much heat can destroy antigens.
12. To prevent sections from detaching from the glass, slides can be treated with VECTABOND[®] Reagent (Cat. No. SP-1800), a non-protein tissue section adhesive. Do not use egg albumin coated slides. Traces of egg white avidin may affect staining quality.
13. After mounting, paraffin sections should be dried in a hot air oven at 50-56 °C. Some slide warmers contain "hot spots" that can overheat tissues.
14. Hand lotions can cause sections to detach from slides or may prevent adequate penetration of reagents. Avoid touching nose, hands with oily hands.
15. Paraffin tissue blocks should be stored in sealed containers in a cool location.
16. Complete depaerification is important. Clearing agents and alcohol solutions should be changed regularly. All steps of the depaerification should be sufficiently long to completely remove the paraffin from the sections.
17. If smaller volumes of working solutions are desired, it is recommended that a drop from the stock solution be dispensed into a small, conical plastic tube. A suitable aliquot can then be withdrawn. To avoid the risk of introducing contaminants, do not remove the drop dispensers from the stock solution bottles.
18. If staining of mast cells or other tissue elements occurs in the absence of primary and secondary antibodies, prepare the ABC reagent in buffer containing 0.3M-0.5M NaCl. This will eliminate undesirable ionic interactions. If this fails to eliminate unwanted staining, use an Avidin/Biotin blocking step (Cat. No. SP-2001) after the serum block step.

The VECTASTAIN[®] ABC Kit contains sufficient reagents to prepare approximately 110 ml of each working solution (500-1000 sections).

VECTASTAIN [®] ABC Kit (Standard)	1 Kit	PK-6100
This Standard Kit consists of only the ABC reagents.		
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Goat IgG)	1 Kit	PK-6105
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Human IgG)	1 Kit	PK-6103
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Mouse IgG)	1 Kit	PK-6102
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Rabbit IgG)	1 Kit	PK-6101
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Rat IgG)	1 Kit	PK-6104
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Sheep IgG)	1 Kit	PK-6106
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Universal)†	1 Kit	PK-6200

The VECTASTAIN[®] ABC Reagent and VECTASTAIN[®] ABC Universal Kit are available in ready-to-use (R.T.U.), pre-diluted formats.

R.T.U. VECTASTAIN [®] ABC Reagent	50 ml	PK-7100
R.T.U. VECTASTAIN [®] ABC Kit (Universal)	50 ml	PK-7200

The following biotinylated antibodies can be used in conjunction with any VECTASTAIN[®] ABC Kit:

Biotinylated Anti-Cat IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9000
Biotinylated Anti-Chicken IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9010
Biotinylated Anti-Goat IgG (H + L) made in rabbit ^{a,d}	1.5 mg	BA-5000
	1.5 mg	BA-9500
Biotinylated Anti-Guinea Pig IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-7000
Biotinylated Anti-Hamster IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9100
Biotinylated Anti-Horse IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9000
Biotinylated Anti-Human IgG (H + L) †	1.5 mg	BA-3000
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H + L) † made in horse ^d	1.5 mg	BA-2000
	1.5 mg	BA-9200
	0.5 mg	BA-2001
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H + L) (Rat Adsorbed) made in horse ^b	1.5 mg	BA-1000
Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H + L) made in goat ^d	1.5 mg	BA-1100
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) made in rabbit ^d	1.5 mg	BA-4000
	1.5 mg	BA-9400
Biotinylated Anti-Rat IgG (H + L) (Mouse Adsorbed) made in rabbit ^c	0.5 mg	BA-4001
(Mouse Adsorbed) made in goat ^c	0.5 mg	BA-9401
Biotinylated Anti-Sheep IgG (H + L) made in rabbit ^{a,d}	1.5 mg	BA-6000
Biotinylated Anti-Swine IgG (H + L) made in goat	1.5 mg	BA-9020
Biotinylated "Universal" Anti-Mouse/Rabbit IgG (H + L) made in horse ^{d,e}	2.1 mg	BA-1400
Biotinylated "Universal" Pan-Specific Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG (H + L) made in horse ^{f,g}	2.2 ml	BA-1300

^a - Suitable for use with biotinylated primary antibodies.

^b - Designed for use in rat tissues.

^c - Designed for use in mouse tissues.

^d - Antibodies included in VECTASTAIN[®] ABC Kits.

^e - Universal Anti-Mouse/Rabbit IgG (BA-1400) should be reconstituted with

2 ml water and diluted 1:50 for use.

^f - Universal Pan-Specific Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG (BA-1300) should be diluted 1:20.

^g - Antibody used in the VECTASTAIN[®] Universal Quick Kits.

† Chain specific antibodies are also available.

Other related reagents also available are:

Antigen Unmasking Solution (dilutes to 25 liters)			
Citrate-based	250 ml	H-3300	
High pH	250 ml	H-3301	
Avidin/Biotin Blocking Kit	1 Kit	SP-2001	
ImmEdge [®] Pen	2-pen set	H-4000	
ImmPrint [®] Pen	3-pen set	H-6100	
VECTABOND [®] Reagent (dilutes to 350 ml)	7 ml	SP-1800	
VectaMount [®] Mounting Medium	60 ml	H-5000	
VectaMount [®] A.Q. Mounting Medium	60 ml	H-5501	
Vector [®] Hematoxylin	500 ml	H-3401	
Vector [®] Hematoxylin QS	100 ml	H-3404	
Vector [®] Methyl Green	500 ml	H-3402	
Vector [®] Nuclear Fast Red	500 ml	H-3403	

Heat-treated, ultrafiltered normal serum from

Goat	20 ml	S-1000	Chicken	20 ml	S-3000
Horse	20 ml	S-2000	Swine	20 ml	S-4000
Rabbit	20 ml	S-5000			

Peroxidase Substrates

ImmPACT [®] DAB (brown)	120 ml	SK-4105
ImmPACT [®] AEC (red)	120 ml	SK-4205
ImmPACT [®] VIP (purple)	120 ml	SK-4605
ImmPACT [®] SG (blue/gray)	120 ml	SK-4705
ImmPACT [®] NovaRED [®] (red)	120 ml	SK-4805
DAB/TS Substrate (brown or gray/black)	1 Kit	SK-4100
AEC Substrate (red)	1 Kit	SK-4200
TMB Substrate (blue)	1 Kit	SK-4400
Vector [®] VIP Substrate (purple)	1 Kit	SK-4600
Vector [®] SG Substrate (blue/gray)	1 Kit	SK-4700
Vector [®] NovaRED [®] Substrate (red)	1 Kit	SK-4800

The kits provide sufficient stock reagents to prepare about 300 ml of substrate solution.

® is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc.

VECTASTAIN[®] ABC Reagents and Kits are designed for laboratory use only.

Detailed product listings, specifications and protocols are available on our website: www.vectorlabs.com

© VECTOR LABORATORIES, INC. 2011 US LEX-1-10

E. Cromógeno DAB

IVD Data Sheet
DS-K047-B
09/23/2009

Stable DAB/Plus Liquid Format

Catalog No.:	K 047
Intended Use:	Substrate/chromogen in conjunction with peroxidase-based immunostaining systems.
Introduction:	DAB, a widely used chromogen for immunoperoxidase staining, is well accepted among pathologists because of its increased sensitivity and ability to give cleaner background as compared to amino ethylcarbazole (AEC). Specimens stained in DAB can be dehydrated, cleared, and mounted for permanent record keeping. Stable DAB/Plus is more sensitive and stable than traditional working DAB solutions.
Product benefits:	Stable DAB/Plus offers several noteworthy improvements and benefits as compared with traditional working DAB solutions: i) Stable DAB/Plus is much more sensitive, providing the cost-effective option of diluting the primary antibody. ii) Being stable for 2 weeks (as opposed to 6 hours for traditional DAB working solutions), Stable DAB/Plus allows the user the convenience of making one working solution for the entire work week. iii) Hazardous waste generation from spent DAB solution is also significantly reduced. iii) Stable DAB/Plus is ideal for high volume labs and automated stainers.
Principle:	Peroxidase from the antibody detection system reacts with H ₂ O ₂ substrate to degrade it, which then reacts with DAB, precipitating it at positive sites yielding a dark brown color.
Components:	i) 5mL. concentrated amber-colored DAB Chromogen Solution. ii) 200mL. clear Stable DAB/Plus Substrate Buffer. iii) One empty mixing dropper bottle.
Precautions:	DAB, a suspected carcinogen, can cause skin irritation upon contact. Avoid contact with clothes and exposed skin. If contacted, flush immediately with tap water. Follow instructions provided by local authorities for disposal.
Storage:	Store at 2-8°C. Reagents and working solution are light sensitive; protect from exposure to light. Store reagents and working solution in opaque bottle. Do not use beyond the expiration dates stated on the labels.
Working Solution:	Aliquot 1mL. of Stable DAB/Plus Buffer in mixing bottle. Add 20µL (one drop) of concentrated Stable DAB/Plus Chromogen. Replace tip and mix. <i>Note: The working Stable DAB/Plus solution is stable for at least 2 weeks and should be prepared in an opaque bottle. Store at 2-8°C when not in use. Any solution not used after this period should be discarded.</i>
Procedure:	i) After peroxidase incubation, wash tissue sections with wash buffer. ii) Wipe slides removing excess buffer. Add enough drops of working Stable DAB/Plus solution to cover tissue sections. iii) Incubate for 5-10 minutes at room temperature. For optimal results, observe reaction under the microscope for signal development. Once the desired signal to noise ratio is achieved, stop the reaction by washing slides in buffer.

IVD: For In Vitro Diagnostic Use

DBS will not be held responsible for patent infringement or other violation that may occur with the use of our product

DBS

1020 Serpentine Lane, # 114, Pleasanton, CA 94566 Tel: 925 484 3350, Fax: 925 484 3390

Website: www.dbiosys.com e-mail: customersupport@dbiosys.com