



Desenvolvimento embrionário dos membros dos vertebrados e suas malformações congénitas

Susana Pascoal, Isabel Palmeirim

Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde / Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho, Braga

Resumo

O embrião de galinha é um dos modelos de eleição para o estudo do desenvolvimento do membro dos vertebrados, devido à facilidade de acesso ao membro do embrião sem comprometer a sobrevivência do mesmo e à sua semelhança com o membro do embrião humano. O estudo do desenvolvimento do embrião de galinha tem permitido grandes avanços na determinação das *vias* de migração celulares e das interações entre células que determinam a correcta formação do membro. A analogia entre o embrião de galinha e o humano tem permitido a extrapolação entre as descobertas realizadas e a medicina, trazendo novos conhecimentos que contribuem para uma melhor compreensão das anomalias congénitas que se observam em membros humanos.

Palavras-chave: Embrião de galinha, vertebrados, desenvolvimento do membro, anomalias no desenvolvimento do membro humano

Acta Pediatr Port 2006;37(5):200-4

Vertebrate limb bud embryonic development and linked congenital malformations

Abstract

The chicken embryo is an excellent model organism for studying vertebrate limb development, due to the ease of manipulating the developing limb *in vivo* and because of the similarities between the human and chicken embryos. Classical chicken embryology has provided fate maps and has elucidated the cell-cell interactions that specify limb patterning. More recently, the role of an increasing number of genes in limb bud development has been uncovered. These genes belong to signaling pathways that work together for perfect limb bud development. The study of limb bud development in chicken is applicable to other vertebrates, as to human, and there are growing links with clinical medicine that bring new inputs in the knowledge of human limb anomalies.

Key-words: chicken embryo, vertebrate, limb bud development, human limb anomalies

Acta Pediatr Port 2006;37(5):200-4

Introdução

Há milhões de anos atrás, os vertebrados existentes na Terra foram obrigados a sair do meio aquático. Para tal, desenvolveram progressivamente membros que lhes permitiram andar, correr e voar, aumentando assim a sua capacidade de sobrevivência. Desde então, e apesar das mudanças adaptativas ocorridas ao longo dos anos subsequentes, o esqueleto dos membros dos tetrápodes tem-se mantido surpreendentemente conservado.

O embrião de galinha é um excelente modelo para estudar o desenvolvimento do membro dos vertebrados devido à sua fácil obtenção, fácil manipulação *in vivo*, e à sua extraordinária semelhança com o embrião humano. Tal como o membro humano, o membro da galinha é constituído por úmero, rádio e cúbito, metacarpos e falanges (Figura 1A). Os membros não são necessários para a sobrevivência embrionária, sendo por isso passíveis de manipulação cirúrgica experimental (remoção, adição ou transplantes de tecidos) para definir interações celulares e moleculares que controlem a sua padronização (definição dos seus eixos e segmentos) e o desenvolvimento harmonioso do seu esqueleto, músculos, tendões, vasos, etc. Para o correcto desenvolvimento dos membros é necessário que ocorra: (1) comunicação entre células de tecidos adjacentes, para que se dê a iniciação da formação do membro, (2) formação de centros sinalizadores, responsáveis pelo estabelecimento dos eixos do membro, (3) intensa proliferação celular, indispensável ao crescimento do membro e (4) morte celular programada e localizada, necessária para esculpir o membro e lhe atribuir a forma correcta.

Iniciação da formação do botão do membro e sua especificação

O desenvolvimento do membro inicia-se com a proliferação de células da mesoderme da placa lateral e migração de

Recebido: 12.09.2006
Aceite: 21.09.2006

Correspondência:

Isabel Palmeirim, MD, PhD
Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS)
Escola de Ciências da Saúde
Universidade do Minho
4710-057 Braga – Portugal
E-mail: ipalmeirim@ecsau.de.uminho.pt

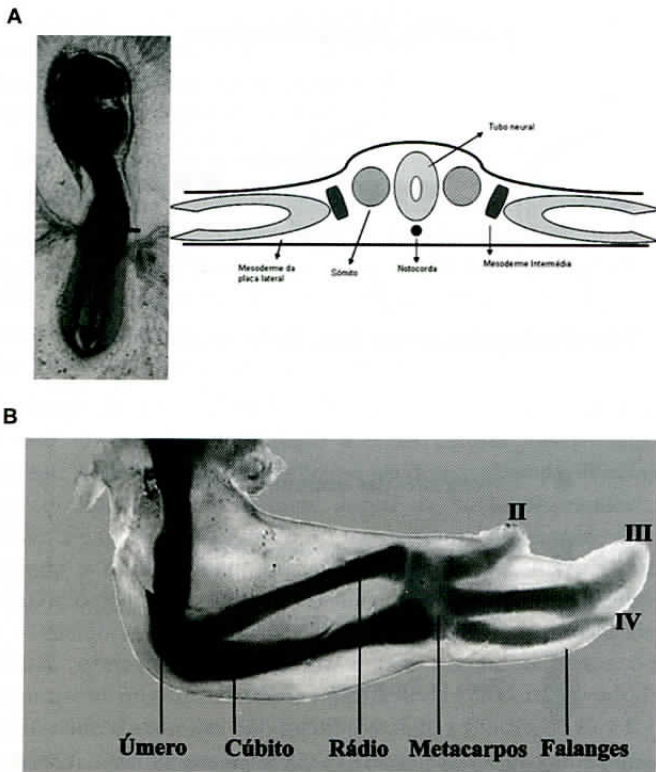


Figura 1 – Fotografia de um embrião de galinha e das estruturas que constituem o seu membro superior. (A) Estruturas esqueléticas que constituem o membro superior de galinha (úmero, cúbito, rádio, metacarpos e falanges). (B) Imagem dorsal de um embrião de galinha com dois dias de incubação e corte transversal do mesmo ao nível do local de formação do membro superior (sómato 15 a 20).

células da mesoderme somática, que se acumulam sob o tecido epidérmico (Figura 1B). Estas células multiplicam-se até criar uma protuberância (botão do membro) que vai proliferar para formar o membro¹. Os músculos, tendões, nervos e vasos do membro derivam de células que migram dos sómitos, enquanto que outros tecidos como a cartilagem, osso e pêlos ou penas derivam da mesoderme da placa lateral.

Os estádios iniciais do botão do membro estão sob a regulação das células da mesoderme intermédia, onde é produzida a molécula *Fibroblast Growth Factor 8* (FGF8). A implantação cirúrgica *in ovo* de uma esfera embebida em FGF8 no flanco de um embrião leva à formação de um membro ectópico, o que significa que esta molécula consegue por si só induzir a formação de um membro¹.

Na galinha, os membros superiores (asas) formam-se ao nível dos sómitos 15 a 20 do tronco do embrião, enquanto que os membros inferiores (patas) formam-se ao nível dos sómitos 25 a 30 (Figura 2). Nos estádios de iniciação do membro, FGF8 é expresso na mesoderme intermédia apenas ao nível destes sómitos, definindo desta forma o local de formação dos membros. Existem vários genes candidatos à determinação da identidade do membro (asa ou pata): o *Pitx1*, cujos transcritos só são detectados no botão da pata e não no botão da asa da galinha; e dois membros da família de genes T-box, *Tbx4* e *Tbx5*, que são especificamente expressos nos botões da pata e da asa da galinha, respectivamente (Figura 2)². Se se induzir a formação de um membro ectópico, ao implantar uma esfera embebida em FGF no tronco do embrião, entre a asa e a pata,

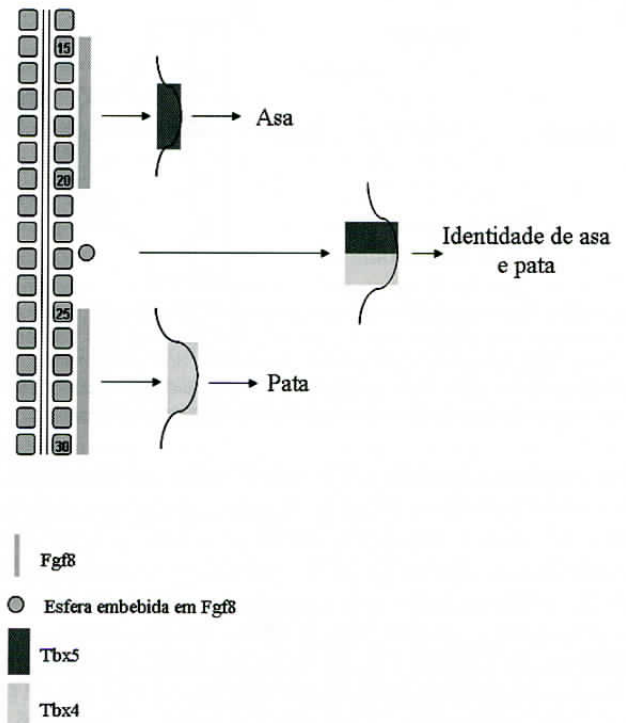


Figura 2 – Esquema ilustrativo da iniciação da formação do membro dos vertebrados. O membro superior (asa) forma-se no tronco do embrião entre o sómito 15 a 20, enquanto o membro inferior (pata) forma-se entre o sómito 25 a 30. A expressão de FGF8 encontra-se ao nível destes sómitos (barra a cinza). Os genes *Tbx5* (cinza escuro) e *Tbx4* (cinza claro) são especificamente expressos na asa e pata da galinha, respectivamente. Estes são uns dos genes candidatos à determinação da identidade do membro. Se se colocar uma esfera embebida em FGF8 (esfera) no tronco do embrião entre os sómitos 20 a 25, forma-se um membro ectópico. Se houver expressão de ambos os *Tbx* nesse membro, o esqueleto formado vai apresentar características de asa e de pata.

o tipo de membro formado vai depender da proteína *Tbx* que é expressa. Se houver expressão das duas proteínas *Tbx* no membro ectópico, obtém-se um membro que contém no seu esqueleto estruturas da asa e da pata (Figura 2).

Padronização dos membros nos vertebrados

No membro dos vertebrados podem identificar-se três eixos: (a) o eixo proximo-distal (p-d), que vai do ombro (proximal) à ponta dos dedos (distal); (b) o eixo anterior-posterior (a-p), que na mão humana corresponde à linha que vai do polegar (anterior) ao quinto dedo (posterior) e (c) o eixo dorso-ventral (d-v), sendo dorsal as costas da mão e ventral a palma (Figura 3A). A determinação destes três eixos resulta da acção de três regiões do botão do membro que apresentam actividade organizadora: (a) a crista ectodérmica apical (AER), que controla o crescimento do membro no eixo p-d³; (b) a zona de actividade polarizadora (ZPA), que controla a organização do eixo a-p⁴ e (c) a ectoderme do membro, que é a responsável pela organização do eixo d-v⁵ (Figura 3B).

- Definição do eixo p-d do membro.

À medida que o botão do membro se desenvolve, as células mesodérmicas induzem a ectoderme envolvente a formar

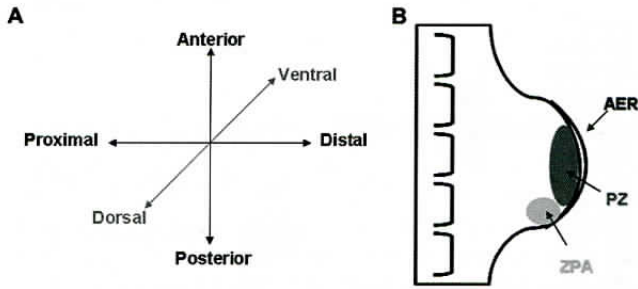


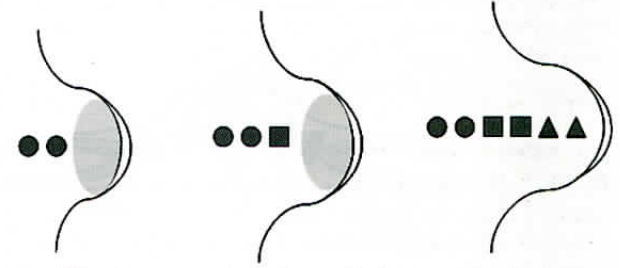
Figura 3 – Representação dos três eixos do botão do membro e das suas respectivas regiões organizadoras, (A) Esquema dos três eixos ao longo dos quais se desenvolve o membro dos vertebrados. (B) Representação das três regiões com capacidade organizadora responsáveis pelo desenvolvimento do membro dos vertebrados.

uma estrutura chamada crista ectodérmica apical (AER) ⁶. Esta crista percorre a margem distal do membro e define a fronteira entre a ectoderme dorsal e ventral (Figura 3B). Imediatamente abaixo da AER, encontra-se um conjunto de células indiferenciadas que compõem a chamada zona de progresso (PZ) ⁷ (Figura 3B). A AER é um dos centros organizadores do membro e a sua remoção cirúrgica pára o crescimento p-d do botão do membro. Quando se remove a AER e esta é substituída por uma esfera embebida em FGF8, o membro desenvolve-se normalmente. Estes resultados sugerem que é o Fgf8 produzido pelas células da AER que mantém o crescimento p-d do membro. Quando a AER é removida em estádios precoces do desenvolvimento do membro, as células da PZ deixam de proliferar e o membro fica truncado, formando-se apenas o úmero. Quando a AER é removida em estádios em que o membro se encontra mais desenvolvido, formam-se mais algumas estruturas (rádio, cúbito, metacarpo). Os resultados desta experiência são explicados pela teoria da Zona de Progresso. Esta teoria suporta a ideia de que as células vão alterando o seu destino durante o tempo que estão na PZ. Desta forma, as células que abandonam a PZ mais cedo vão formar as estruturas ósseas mais proximais (úmero), enquanto que as células que sofrem um maior número de divisões celulares e deixam a PZ em último lugar, dão origem aos elementos mais distais do membro (falanges). Segundo esta teoria, o número, tipo e posição dos ossos é determinado pelo tempo que as células passam na zona de progresso ⁷ (Figura 4).

- Definição do eixo a-p do membro.

Em 1968, observou-se que transplantar células da região mais posterior do mesênquima do membro para a região anterior de um membro hospedeiro dava origem a um membro cujos dígitos se encontravam duplicados em imagem espelho. Tendo em conta que o padrão normal dos dígitos da galinha é dígito2- dígito3- dígito4 (2-3-4), este padrão alterava-se para (4-3-2-2-3-4) (Figura 5). Estes dígitos adicionais não derivam das células transplantadas mas do embrião hospedeiro e este efeito é tanto mais marcado quanto maior o número de células transplantadas. Estes resultados sugerem que as células desta região posterior do mesênquima, agora denominada “zona de actividade polarizadora” (ZPA), produzem uma substância que difunde em gradiente e que é responsável pela organização do eixo a-p do botão do membro ⁴.

Modelo da Zona de Progresso



Especificação progressiva ao longo do eixo proximo-distal

- Precusores dos elementos proximais
- Precusores dos elementos intermédios
- ▲ Precusores dos elementos distais
- Zona de Progresso

Figura 4 – Esquema do modelo da zona de progresso, onde a especificação das estruturas que formam o membro é progressiva ao longo do eixo p-d.

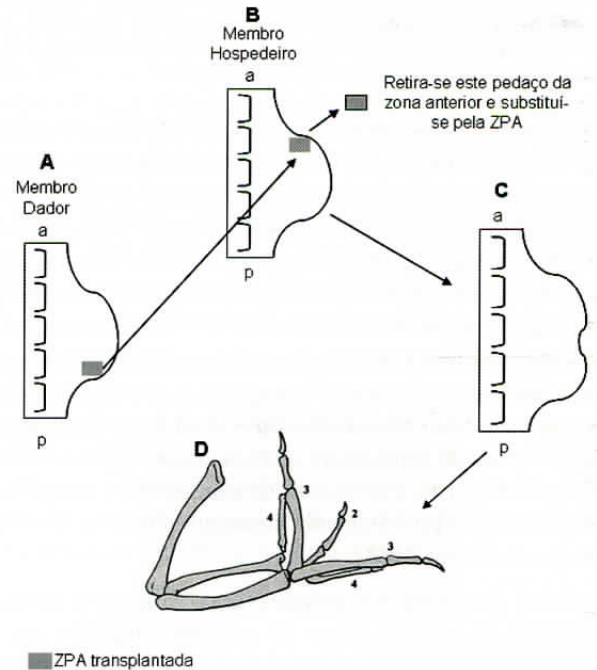


Figura 5 – Reorganização do membro dos vertebrados após transplante da ZPA para a parte anterior do membro. Remoção da ZPA de um membro dador (A) e sua respectiva colocação na parte anterior de um membro hospedeiro (B). Após alguns dias de incubação pode-se observar a reorganização do membro (C) que após o seu desenvolvimento apresenta estruturas ósseas duplicadas em imagem em espelho (D).

A natureza molecular do sinal produzido pela ZPA foi estabelecida em 1990 através da identificação de um gene denominado *Sonic Hedgehog* (*shh*) ⁸. Shh é uma molécula produzida apenas na ZPA, que difunde e actua como um morfogénio: as

células que recebem uma concentração elevada de Shh formam o dígito mais posterior (dígito 4), enquanto que as células mais afastadas desta região recebem uma concentração menor de Shh e formam o dígito mais anterior (dígito 2) ⁸.

- Definição do eixo d-v do membro.

O mesênquima contém toda a informação necessária para a padronização d-v do membro transferindo-a posteriormente para a ectoderme envolvente ⁹. Quando se roda a ectoderme 180° relativamente ao mesênquima, as estruturas mesênquimatosas (esqueleto e músculo) tornam-se invertidas, de acordo com a nova polaridade da ectoderme ¹⁰.

O factor de transcrição *Lmx1b* é expresso no mesênquima dorsal do membro atribuindo a essas células um carácter dorsal. À medida que o membro se vai desenvolvendo, *Wnt7a*, que é expresso na ectoderme dorsal do botão do membro, induz a expressão de *Lmx1b* no mesênquima subjacente, atribuindo a essas células um carácter dorsal. Na ausência de *Wnt7a*, o padrão dorsal das estruturas distais não se estabelece e os membros que se formam são bi-ventrais. A expressão de *Wnt7a* é restrita à ectoderme dorsal porque o factor de transcrição *Engrailed1* (*En1*) reprime-a na ectoderme ventral, local onde é expresso. Em membros onde a função de *En1* foi anulada, o *Wnt7a* passa a estar expresso por toda a ectoderme, formando-se estruturas distais com um carácter bi-dorsal ¹¹.

Morte celular programada na formação do membro

A morte celular apresenta um papel importante na modelação do membro, ocorrendo em quatro regiões específicas, a zona necrótica interior, anterior, posterior e interdigital. O rádio e o cúbito são separados entre si pela zona necrótica interior, enquanto que a zona necrótica anterior e posterior conferem a forma ao membro. Estudos sobre a zona necrótica interdigital são realizados nos membros inferiores do pato e da galinha que diferem na ocorrência de morte celular entre os dígitos, envolvendo a formação ou não, de membranas interdigitais. Saunders e colegas ¹² demonstraram que na galinha, as células situadas entre a cartilagem dos dígitos estão destinadas a morrer, mesmo quando transplantadas para outra região do embrião ou colocadas em cultura. Este comportamento só é alterado quando estas células são transplantadas para o membro de um pato. O gene *BMP4* é expresso nos espaços interdigitais do membro da galinha e é o responsável pela indução de morte celular na zona interdigital. Este gene não se expressa no membro inferior do pato, explicando a presença de membranas interdigitais ¹³.

Conexões com o membro humano

Nos últimos anos têm vindo a aumentar as descobertas no campo da biologia do desenvolvimento com aplicação em medicina. Descobriu-se que mutações nos receptores dos FGFs são responsáveis pela acondroplasia e outras anomalias dos dígitos como a síndrome de Apert que é caracterizada por sindactilia nos membros superiores e inferiores ¹⁴. A activação do receptor FGFR3 é a principal causa de vários graus de nanismo ¹⁵. Mutações no FGFR2 são responsáveis por várias sín-

dromes em humanos, como é o caso da síndrome de Pfeiffer e de Jackson-Weiss, que apresentam anomalias severas ao nível dos membros inferiores ^{16,17}. Mutações no gene *Hoxd13* e no gene *Gli* estão associadas à polisindactilia humana e à cefalopolisindactilia de Greg ^{18,19}. Estes genes são também cruciais no desenvolvimento do membro da galinha. Os genes *Tbx* estão implicados na síndrome Holt-Oram (*Tbx5*) caracterizada por malformações nos membros superiores, como fusões nos ossos do carpo, e na síndrome cúbito-mamário (*Tbx3*), associada à haploinsuficiência de *Tbx3* onde as estruturas posteriores, incluindo os dígitos, não se formam. O mesmo se observa nas experiências de sobre-expressão para estes genes realizadas em galinha ²⁰. A lista de genes responsáveis pelos defeitos dos membros em pacientes humanos é cada vez maior, o que dá origem a uma necessidade crescente em compreender como é que mutações específicas de um gene levam a fenótipos tão precisos.

Conclusão

O trabalho experimental em embriões de galinha tem contribuído para o conhecimento do desenvolvimento do membro dos vertebrados. Devido à sua semelhança com o embrião humano, o embrião de galinha tem sido cada vez mais usado no estudo das interações celulares e moleculares que regulam o seu desenvolvimento, sendo possível extrapolar as descobertas realizadas nesta área para os humanos. Experiências realizadas no membro de embrião de galinha têm permitido descobrir quais os genes essenciais à sua formação, à padronização do seu esqueleto, e à modelação da sua forma. Desta forma, podemos actualmente compreender fenótipos como a sindactilia, a polidactilia e outros observados em inúmeras síndromes genéticas humanas.

Agradecimentos

Agradecemos a Rute Moura, Raquel Andrade e a Lucília Goretí Pinto pelos comentários produtivos feitos após a leitura do artigo. Susana Pascoal (SFRH/BD/8657/2002) foi financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Referências

1. Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 1996;84:27-36.
2. Rodríguez-Esteban C, Tsukui T, Yonei S, Magallon J, Tamura K, Izpisua Belmonte JC. The T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity. *Nature* 1999;398:814-8.
3. Saunders JW Jr. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* 1948; 108: 363-404.
4. Saunders JW Jr, Gasseling MT. Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. In: R. Fleischmajer e R. E. Billingham (eds.), *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1968; pp.78-97.
5. MacCabe JA, Errick J, Saunders JW Jr. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol* 1974; 39:69-82.

6. Saunders JW Jr, Reuss C. Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo. *Dev Biol* 1974;38:41-50.
7. Summerbell D, Lewis JH, Wolpert L. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 1973;244:492-6.
8. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993;75:1401-16.
9. Geduspan JS, MacCabe JA. Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat Rec* 1989;224:79-87.
10. MacCabe JA, Errick J, Saunders JW Jr. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol* 1974;39:69-82.
11. Chen H, Johnson RL. Interactions between dorsal-ventral patterning genes *lmx1b*, *engrailed-1* and *wnt-7a* in the vertebrate limb. *Int J Dev Biol* 2002;46:937-41.
12. Saunders JW Jr, Gasseling MT. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol* 1962;5:147-78.
13. Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 1996;272:738-41.
14. Wilkie AO. Why study human limb malformations? *J Anat* 2003;202:27-35.
15. Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 1996;13:233-7.
16. Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, et al. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* 1994;8:275-9.
17. Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Baraitser M, Hayward R, Jones B, et al. Identical mutations in the *FGFR2* gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet* 1995;9:173-6.
18. Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in *HOXD13*. *Science* 1996;272:548-51.
19. Hui CC, Joyner AL. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 1993;3:241-6.
20. Suzuki T, Takeuchi J, Koshiba-Takeuchi K, Ogura T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* 2004;6:43-53.