

Introdução aos aspectos descritivos e moleculares da somitogênese humana

1. O mesoderma paraxial e seus derivados: formação e organização dos somitos

A transformação do disco embrionário em uma estrutura trilaminar e a formação do processo notocordal e da placa precordal, consequências do processo de gastrulação, constituem precondições essenciais para que, aproximadamente a partir do fim da terceira semana após a fertilização, dois programas de desenvolvimento embrionário, morfológicamente independentes mas precisamente coordenados tanto espacial como temporalmente comecem quase simultaneamente a operar no embrião. Um é a *neurulação* que ocorre na porção mais cranial do ectoderma e leva à formação das estruturas da cabeça e do tubo neural. O outro, que será estudado aqui, é a *somitogênese*, responsável pela especificação e subdivisão segmentar inicial do tronco do embrião, permitindo a formação da coluna vertebral, da musculatura esquelética e partes da derme, e que tem lugar no mesoderma paraxial. Esta população celular formada a partir de células originárias da extremidade mais cranial da linha primitiva, se organiza inicialmente em duas colunas longitudinais dispostas simetricamente de cada lado

do processo notocordal as quais se segmentarão progressivamente em sentido crânio caudal, entre o final da terceira e a quarta semana (Figura 1).

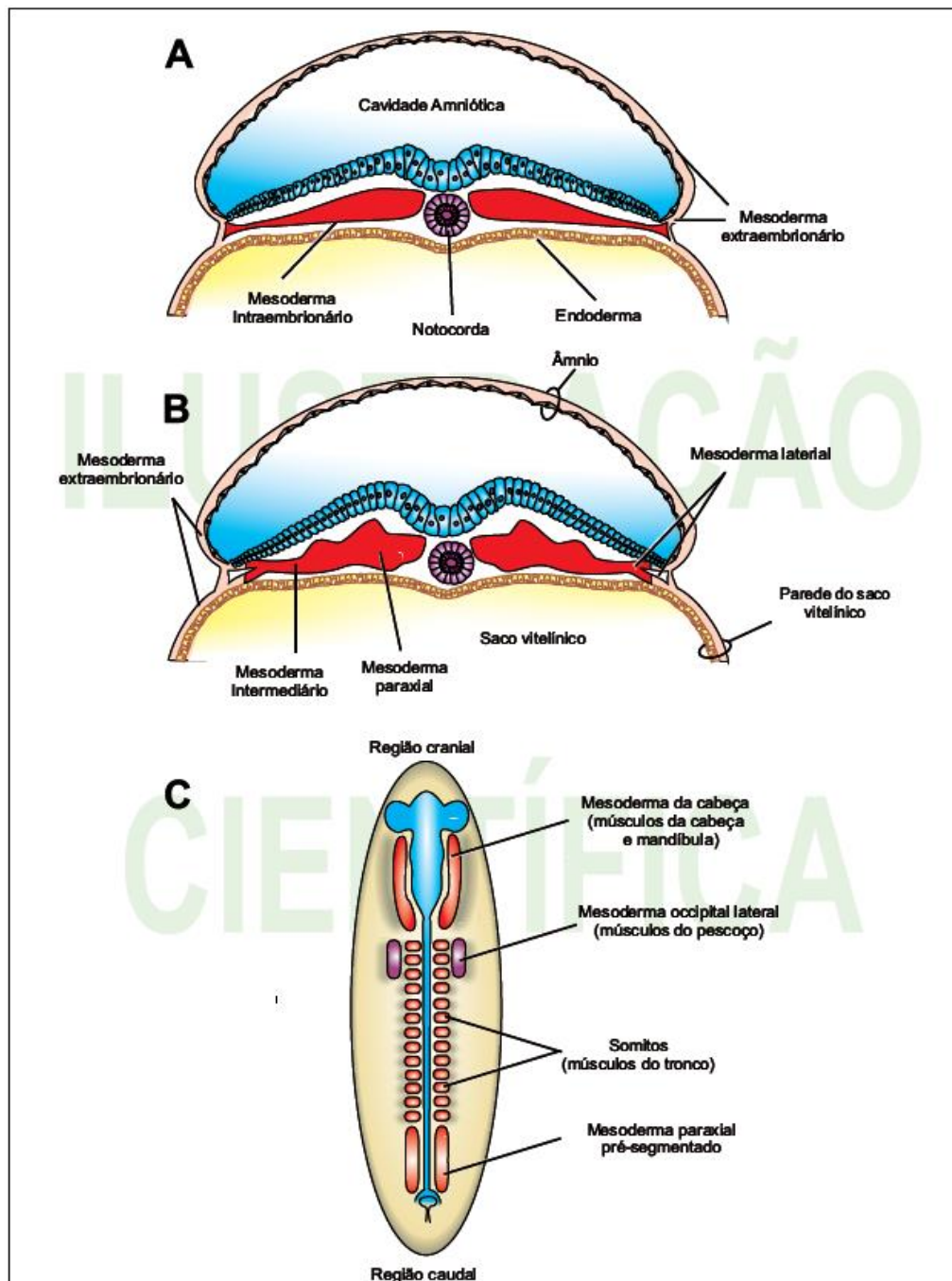


Figura 1. Diferenciação do mesoderma paraxial e condensação dos somitos. **(A)** Esquema de um embrião de 16-17 dias cortado transversalmente ao nível da região do futuro tronco antes da subdivisão do mesoderma intraembrionário. **(B)** Esquema de um embrião de cerca de 19 dias cortado transversalmente no mesmo nível que em (A), após a subdivisão do mesoderma intraembrionário em paraxial, intermediário e da placa lateral. O mesoderma paraxial começa já a condensar-se para formar os primeiros somitos. **(C)** Esquema mostrando a progressão da somitogênese ao longo do eixo crânio caudal. A formação dos primeiros somitos ocorre ao nível da futura região do pescoço e continua caudalmente a uma taxa de 3-4 por dia, acompanhando a porção medular do tubo neural.

Em aves e em diversos mamíferos, a primeira evidência de segmentação é observada na região cranial do mesoderma paraxial, onde estruturas aproximadamente esféricas formadas por células organizadas em espirais concêntricas, denominadas *somitômeros* começam a se individualizar. Os primeiros somitômeros a serem formados são estruturas temporárias, que eventualmente perdem seu caráter segmentar, se descondensam e terminam por diferenciar-se na musculatura estriada da face e da faringe. Os que se formam a seguir, continuam a se condensar, individualizando-se, e adquirem características epiteliais, dando origem aos primeiros somitos, que se formam na futura região occipital do embrião (Figura 1B). Em humanos, a existência de um estágio de somitômeros é controversa, tendo sido sugerido que a porção mais cranial do mesoderma paraxial não se segmenta, dispersando-se diretamente em mesênquima frouxo que posteriormente se diferenciará na musculatura da face, mandíbula e pescoço. O início da condensação dos primeiros somitos ocorre na transição da terceira para a quarta semana após a fertilização e nos 10-12 dias seguintes, à medida que a linha primitiva regride e o disco embrionário se alonga longitudinalmente, cerca de 43 pares de somitos são formados em progressão crânio caudal, acompanhando a notocorda, numa média de 3 a 4 somitos por dia (Figura 1C). Os pares mais caudais eventualmente regridem entre a quinta e sexta semana, deixando um número final de 37. Os primeiros quatro pares de somitos a se formarem contribuirão principalmente para a formação de parte do osso occipital e de alguns ossos do nariz e da orelha interna. Os oito pares seguintes formarão as

vertebras cervicais juntamente com a sua musculatura e a derme do pescoço, seguido por 12 pares de somitos torácicos que originarão as vertebrae torácicas, a musculatura da parede do tórax e a derme torácica. Dos 10 pares de somitos que se formam em seguida, os 5 pares mais craniais darão origem às vertebrae lombares, a musculatura e a derme abdominal, enquanto os 5 pares mais caudais se desenvolverão nas vertebrae sacrais, sua musculatura e derme associadas. Por último, os três pares que ainda permanecem após a regressão dos somitos caudais mencionados acima, se organizam para formar o cóccix. Devido a regularidade com que os somitos são formados ao longo do tempo, e a facilidade com que podem ser contados no embrião, seu número é frequentemente utilizado para estimar o estágio embrionário preciso durante a quarta semana.

2 Subdivisão dos somitos e seu destino ulterior

Logo após sua formação, cada somito inicia individualmente um processo de remodelação e diferenciação que culmina na ruptura de sua superfície medial, produzindo duas populações celulares distintas, não só fenotipicamente como também em relação ao seu destino embriológico: O *esclerótomo*, um grupo de células de características mesenquimais, derivadas das regiões ventromedial e central do somito; e o *dermomiótomo*, formadas pelas células restantes (Figura 2A-B).

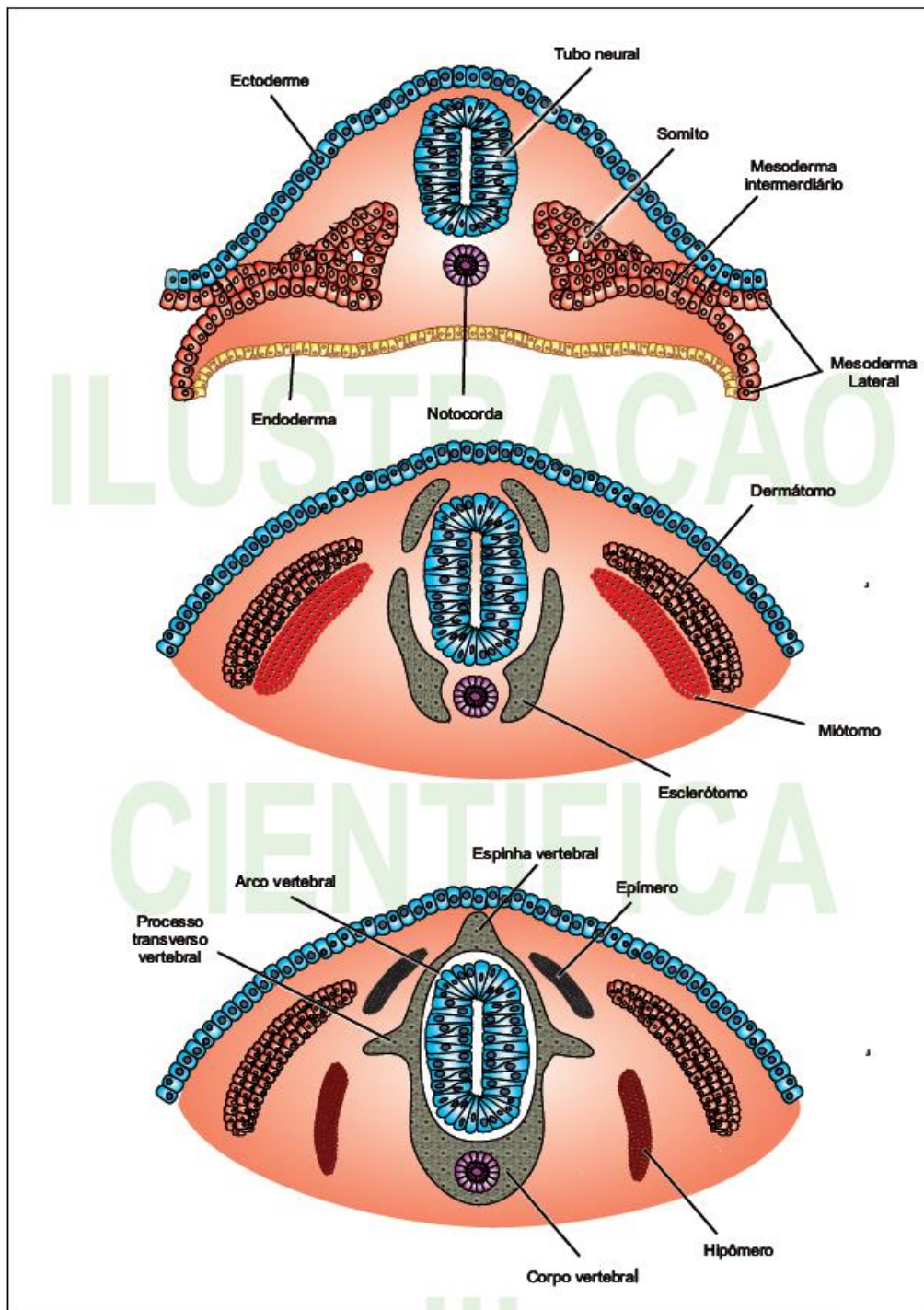


Figura 2. Cortes transversais esquemáticos, aproximadamente ao nível cervical, de três embriões em estágios progressivamente mais avançado de diferenciação somítica. O esquema superior representa um embrião no final da terceira semana. O somito encontra-se em sua fase epitelial. O esquema intermediário mostra o embrião em meados da quarta semana. As células da porção ventromedial do esclerótomo adquiriram características mesenquimais e migraram para a região do tubo neural e notocorda. A porção restante do somito (dermomiótomo) começa a se diferenciar em uma região precursora da musculatura (miótomo) e outra da derme (dermátomo). Finalmente o esquema inferior representa o embrião em torno da quinta semana. O esclerotomo envolve completamente o tubo neural e a notocorda e começa a se diferenciar nas diferentes partes da vértebra. O miótomo se subdivide em duas massas celulares, o epímero e o hipómero, que se diferenciarão respectivamente musculatura dorsal e ventrolateral do tronco.

As células do esclerótomo irão migrar medialmente terminando por circundar inteiramente o tubo neural em formação e a notocorda, onde se diferenciarão nos elementos da coluna vertebral (Figura 2, esquema central). Um aspecto importante deste processo é a “ressegmentação” no qual a porção caudal de cada esclerótomo se funde com a parte cranial do esclerótomo imediatamente caudal a ele (Figura 3A).

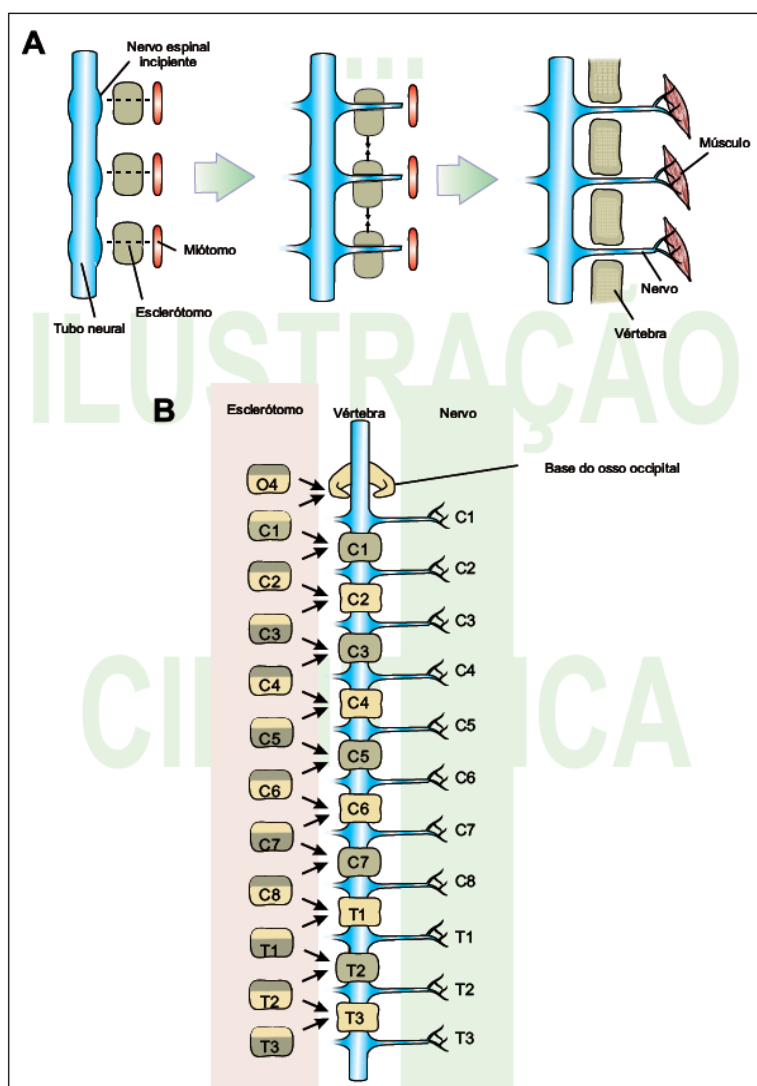


Figura 3. Ressegmentação do esclerótomo durante a formação das vertebrae. **(A)** Durante o processo de sua associação ao tubo neural, a porção caudal de cada esclerótomo se funde com a porção cranial do esclerótomo imediatamente inferior, permitindo com isso a passagem dos nervos segmentais que emergem da medula espinhal para inervar os miótomos. **(B)** Devido ao processo de ressegmentação a porção cranial do primeiro somito cervical contribui para a formação do osso occipital. Conseqüentemente apenas sete vertebrae cervicais serão formadas,

embora oito somitos cervicais encontrem-se originalmente presentes. (Modificado de Schoenwolf G. C. et al [2010] *Larsen Embriologia Humana*, 4ª Edição.)

A consequência direta da ressegmentação é que cada vertebra se forma em uma posição intersegmentar, permitindo a saída correta dos nervos segmentares da medula espinhal e a funcionalidade dos músculos segmentares. Adicionalmente permite entender porque oito pares de somitos são necessários para formar as sete vertebra cervicais do adulto (Figura 3B). Finalmente, algumas poucas células que permanecem na região onde ocorre a separação das porções cranial e caudal de cada esclerótomo darão origem ao anel fibroso externo do disco intervertebral, enquanto a porção interna, o núcleo pulposo será formado por células notocordais, as quais acabarão por desaparecer nos primeiros anos de vida. As regiões restantes da notocorda terminam envolvidas pelos corpos vertebrais em desenvolvimento e rapidamente degeneram.

Ao mesmo tempo em que ocorre a migração das células do esclerótomo, o dermomiótomo, que retém o caráter epitelial do somito original se divide em dois grupos: as células da região ventrolateral, juntamente com algumas populações dorsomediais que se posicionam ventralmente, irão formar o *miótomo*, precursor da musculatura da parede do corpo e dos membros, enquanto que a camada mais dorsal forma o *dermátomo* que irá posteriormente contribuir para a diferenciação da maior parte da derme dorsal (Figura 2, esquema central). O miótomo posteriormente se dividirá em duas massas celulares, o *epímero*, mais dorsal e o *hipômero*, localizado mais ventralmente (Figura 2, esquema inferior). O primeiro

dará origem principalmente a musculatura espinhal e o segundo aos músculos das paredes lateral e ventral do tórax e do abdome. É importante enfatizar que, da mesma maneira que a sua condensação inicial, a diferenciação posterior dos somitos segue uma sequência temporal crânio-caudal, de maneira que quando os últimos somitos caudais ainda estão em formação, os craniais encontram-se já na fase de separação entre esclerótomo e dermomiótomo.

3. Controle Molecular da segmentação do mesoderma paraxial: modelo “relógio e frente de onda”

A segmentação do mesoderma paraxial em somitos é a representação mais evidente de um processo de metamerização inicial do embrião vertebrado ao longo de seu eixo crânio-caudal, que pode ser observado também, em menor escala, nas etapas iniciais de desenvolvimento de outras estruturas como o sistema nervoso e a faringe. Molecularmente a condensação dos somitos, estudada primariamente em aves, resulta de dois processos agindo de maneira precisamente coordenada: O primeiro deles se relaciona com a ativação cíclica no mesoderma paraxial ainda não condensado da região caudal do embrião (mesoderma paraxial pré-somítico) de um circuito gênico altamente conservado durante a evolução dos vertebrados e cujos componentes formam um “oscilador” ou “relógio” molecular que controla o ritmo de segmentação do disco embrionário ao longo de seu eixo longitudinal. (Figura 4C). Todos os genes pertencentes a este circuito identificados até o momento fazem parte dos sistemas de sinalização intercelulares mediados por Notch e Wnt.

Seu funcionamento conjunto estabelece uma complexa rede de alças de retroalimentação positivas e negativas entre estas duas vias sinalizadoras que resultam em ondas de ativação periódica de Notch e de seus efetores propagando-se pelo mesoderma paraxial ainda não segmentado, no sentido caudal para cranial (Figura 4B).

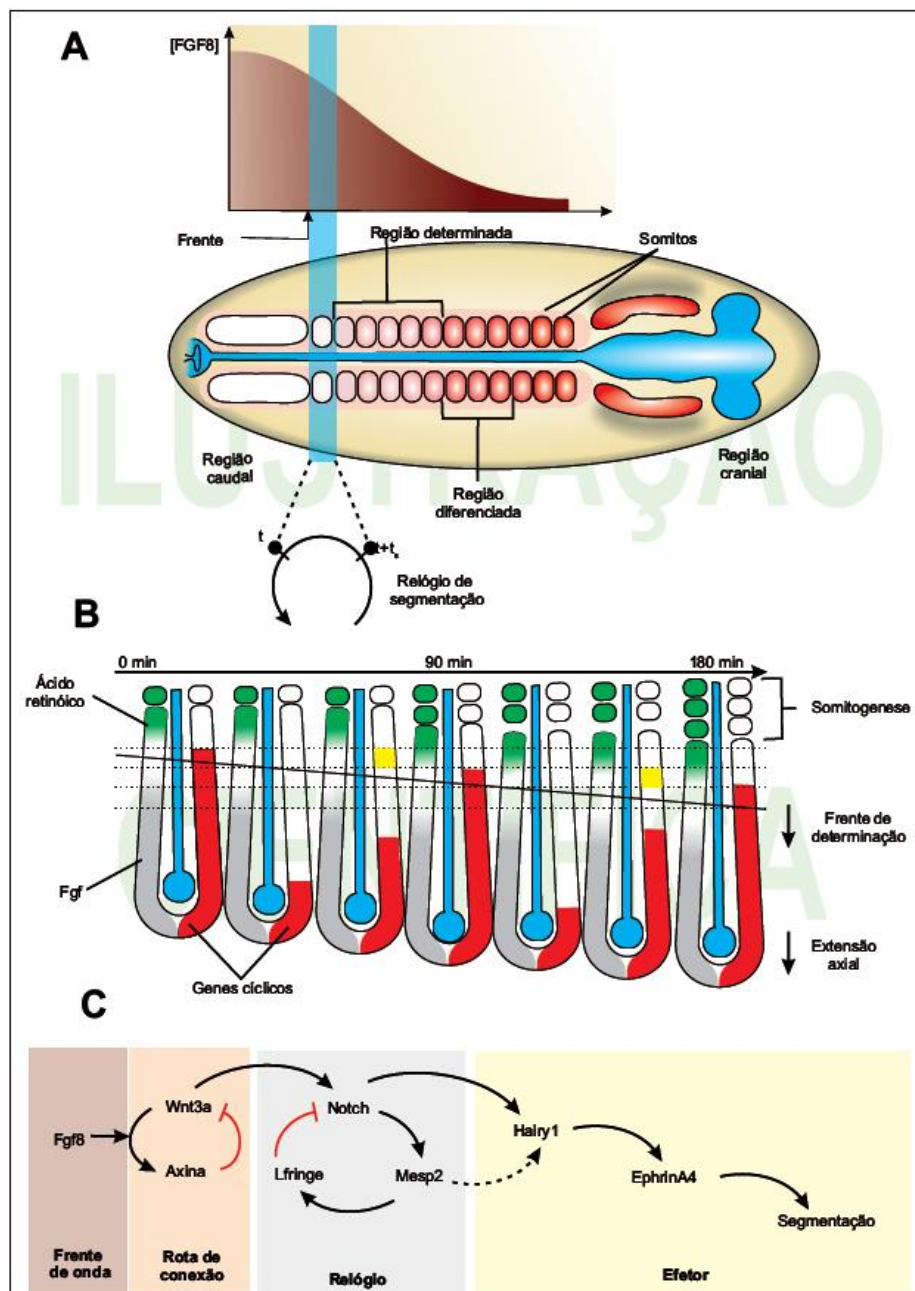


Figura 4. Modelo “relógio e frente de onda” da somitogênese. **(A)** Esquema resumindo as interações entre a “frente de onda”, formada por um gradiente móvel de concentração de FGF 8 no sentido caudal para cranial e um oscilador, ou relógio, molecular que regula a expressão cíclica de genes controladores do processo de condensação do mesoderma paraxial em blocos somíticos discretos. A coincidência na expressão dos genes do oscilador dentro da área de concentração permissiva de FGF-8 resulta no estabelecimento de uma zona de competência (“zona de determinação”), indicada pela faixa vertical azul, onde começará a se formar um novo somito. **(B)** Devido à extensão longitudinal do disco embrionário ao longo do tempo, a frente de determinação (linha diagonal) move-se progressivamente em direção caudal, produzindo novos somitos a intervalos de tempo regulares que dependem do ciclo do oscilador (90 minutos no caso de embriões de galinha). A região originalmente dentro da frente de determinação no início do ciclo é em seguida marcada (bloco amarelo) para expressar o programa de epiteliação que resultará mais adiante na sua condensação e individualização. A presença de um gradiente de ácido retinóico (em verde) oposto ao de FGF-8 parece contribuir para tornar mais estável a frente de determinação. **(C)** Principais componentes da provável via molecular geral controlando a somitogênese em vertebrados. O nível local de FGF-8 no mesoderma paraxial controlaria a atividade cíclica da via de Wnt, que por sua vez modularia a frequência do oscilador dependente da via de Notch. A atividade desta última induz expressão dos fatores de transcrição Mesp2 (ele próprio um componente central do oscilador) e Hairy, que regulam diretamente o programa de individualização e epiteliação dos somitos através do controle da expressão de efetores como a molécula de adesão Efrina A4

O segundo processo está associado a presença no mesoderma paraxial de um gradiente de concentração de FGF-8, no sentido caudal-cranial, gerado em consequência de sua secreção encontrar-se restrita exclusivamente às células do mesoderma pré-somítico mais caudal, recém-saído da linha primitiva. A atividade relativa deste gradiente, cuja concentração varia dinamicamente em cada região também ao longo do tempo devido à expansão longitudinal do disco embrionário, define uma “zona de competência” (ou “zona de determinação”) para recepção do sinal mediado por Notch¹ (Figura 4A). Esta zona de competência se move progressivamente em direção caudal e seu deslocamento contínuo, (“frente de

¹ Em mamíferos um segundo gradiente de concentração, este formado por ácido retinóico (produzido somente pelo mesoderma já segmentado), em sentido oposto de FGF e antagonizando sua atividade também está presente e acredita-se que contribua para refinar e tornar menos sujeito a perturbações externas o processo de estabelecimento, da zona de competência.

onda”) em cooperação com a ativação periódica do “oscilador” resulta na delimitação sucessiva dentro do mesoderma paraxial, a intervalos regulares tanto no espaço como no tempo, de bordas entre populações celulares que logo iniciarão o processo de condensação e o mesoderma pré-somítico imediatamente caudal a elas. (Figura 4B). Deve ser ressaltado que importantes anomalias congênicas humanas associadas a defeitos no número e organização das vertebrae como a disostose espondilocostal foram correlacionadas a mutações em genes envolvidos na via de sinalização de Notch.

Já a especificação dos componentes do esclerótomo e do dermamiótomo em cada somito resulta primariamente de sinais provenientes de estruturas vizinhas, notadamente a notocorda, o tubo neural em fechamento, o ectoderma sobrejacente e o mesoderma da placa lateral. Assim a formação do esclerótomo depende da produção e secreção de Sonic Hedgehog (Shh) pela notocorda e pelo assoalho do tubo neural, e de Noggin pela notocorda. A ação cooperativa destas proteínas define e assegura a sobrevivência de uma população de células precursoras esclerotomais localizadas ventro-medialmente no somito, além de induzir expressão dos fatores de transcrição Pax 1 e Pax 9 (proteínas *paired box* 1 e 9). A presença destas duas proteínas é crítica tanto para o desencadeamento do processo de transição epitélio-mesênquima que permite às células do esclerótomo deixar a região do somito e migrar em direção a notocorda e ao tubo neural como também para a ativação subsequente do programa de ossificação das vertebrae.

Paralelamente a migração e diferenciação do esclerotomo, o *dermomiótomo* é inicialmente especificado a partir de sinais dependentes de proteínas Wnt secretadas pela porção dorsal do tubo neural e do ectoderma sobrejacente e suas células passam inicialmente a expressar os fatores de transcrição Pax-3 e Pax-7. Já os mecanismos moleculares levando a posterior subdivisão em dermátomo e miótomo não estão completamente claros, mas parecem depender de um delicado equilíbrio entre os níveis de Wnt, Shh e BMP-4 nas diferentes regiões do dermomiótomo. Assim, as células de sua porção dorso-medial, mais próximas da notocorda e do tubo neural estão expostas a níveis mais altos de Shh (que como foi visto anteriormente é secretado por estas duas estruturas) e de Wnt, enquanto a expressão de BMP-4, produzido pela ectoderme e pelo mesoderma da placa lateral, é reprimida pela presença de Noggin. Esta combinação de influências leva a repressão dos genes pax-3 e pax-7 e ao mesmo tempo permite àquela população celular expressar de fatores de transcrição centrais para a indução da miogênese como Myf-5 MyoD e Mef-2 (BMP-4 é um importante inibidor da via miogênica). Esta população do miótomo dará origem aos precursores do epímero (Figura 2, esquema inferior). Uma segunda população, mais lateral, também se incorporará posteriormente ao miótomo originando o hipômero. Finalmente as células da porção central do dermomiótomo continuam expressando Pax-3 e Pax-7, e posteriormente, passam por um processo de transição epitélio mesênquima dependente da secreção de Neurotrofina-3 produzida pelo tubo neural, e migram

para a porção dorsal do ectoderma, onde em resposta a presença de Wnt secretado pela epiderme em desenvolvimento irão se diferenciar nos elementos da derme.