



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Alessandra Maria Duarte Barauna

Análise, *in silico*, das interações de proteínas envolvidas na migração de progenitores de melanócitos pela rota lateral

Florianópolis
2020

Alessandra Maria Duarte Barauna

Análise, *in silico*, das interações de proteínas envolvidas na migração de progenitores de melanócitos pela rota lateral

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra

Barauna, Alessandra Maria Duarte
Análise, in silico, das interações das proteínas
envolvidas na migração de células da crista neural truncal
pela rota lateral / Alessandra Maria Duarte Barauna ;
orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2020.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Biologia
celular. 3. Crista neural. 4. Migração Celular. I. Garcez,
Ricardo Castilho. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

Alessandra Maria Duarte Barauna

Análise, *in silico*, das interações de proteínas envolvidas na migração de progenitores de melanócitos pela rota lateral

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Diego Amarante da Silva
l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay – CNRS

Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Alice Hendrich Prompt
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Evelise Maria Nazari
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado as pessoas que mais me apoiaram durante essa jornada, meus pais, Artur e Aurenir.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Universidade Federal de Santa Catarina que me acolheu por 7 anos, tornando-se quase minha terceira casa. Aos órgãos de fomento, que quase não existem mais, diante desse desgoverno, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- Capes. Ao Laboratório de Células Tronco-LACERT por todo o auxílio durante essa caminhada e à FUGAP-Fundação Garcez de Apoio a Pesquisa por financiar tantas coisas durante esses tempos obscuros.

Gostaria de agradecer também, meu querido orientador, Prof. Dr. Ricardo Garcez, que com o passar dos anos, senti que ganhei mais um amigo nessa jornada. Obrigada por toda a paciência e todas as conversas, elas foram essenciais pro meu desenvolvimento e pro desenvolvimento desse trabalho.

A todos meus colegas de laboratório, que estão comigo desde os primórdios dos tempos, ou ainda que chegaram agora. Obrigada.

Aos meus companheiros de bancada, Dani, Felipe e Jaque, obrigada por alegrarem meus dias, me incomodarem e me tirarem do sério. Espero que não destruam o laboratório sem mim. PS: fechem a porta. SEMPRE.

As meninas do LIAA, Gab, Caire, Nicole, Natan, Flavinho e Gustavo, obrigada pelos intermináveis cafés, chopitos, fofocas e conselhos. Espero que nossa amizade perdure por muitos anos.

Aos meus amigos de graduação e de vida: Maiara, obrigada por estar do meu lado nas bads e nas baladas. Fernandinho, mesmo você gostando de plantas, eu gosto de você. Muito obrigada por sua amizade e sua paciência, ou a falta dela. E Sabrina, que eu não tenho nem palavras pra descrever o quão você tem sido e é importante em minha vida. Muito obrigada pelo apoio incondicional, pelo ombro amigo, pelas caronas, pelas noites e pelos dias. Sorte a minha de ter alguém tão dedicada como você.

Ao meu amigo Gabriel Pescador, que mesmo longe me auxilia sempre que possível. Muito obrigada por essa amizade, sinto sua falta.

Aos meus amigos Gustavo, Caio e Monique, muito obrigada pela amizade de vocês. Vocês foram essenciais para esse trabalho acontecer, sem vocês, eu teria pirado, podem ter certeza.

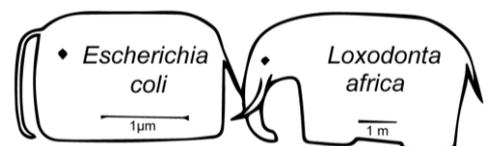
Aos meus amigos da eterna Liberdade, vocês moram no meu coração, mesmo sendo uns furões.

À minha família de santo e em especial ao Pai Wellington D'Ósùn Opará por ser sempre tão paciente e solícito comigo e me fazer sentir sempre acolhida.

Ao meu namorado, Frederico, acho que já teria enlouquecido sem você. Obrigada por estar comigo em minhas crises, por tentar me entender, pela paciência incondicional, por todo o cuidado, carinho e dedicação que tens comigo. Você esteve comigo em momentos que nem eu queria estar. Obrigada.

Aos meus pais Aurenir e Artur, que sem eles eu nunca poderia ter chegado até aqui. Muito obrigada por sempre me apoiarem, mesmo não concordando com minhas escolhas. Vocês são meu porto seguro e meu exemplo de caráter e honestidade. Amo vocês.

Dada a minha memória nos últimos tempos, tenho certeza que esqueci alguém, por isso, já peço desculpas. Mas saibam que o importante é o que importa.



“O que vale para uma *E. coli* também vale para os elefantes”

MONOD, Jacques, 1954

RESUMO

Os melanócitos são células originadas a partir da crista neural (CN). Suas principais funções estão ligadas à sua capacidade de produzir melanina, proteína que auxilia na absorção dos raios ultravioletas, conferindo fotoproteção para a maioria dos vertebrados. A CN é uma população de células multipotentes dividida em dois grandes domínios, a crista neural truncal, que dará origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico e melanócitos; e a crista neural cefálica que originará os mesmos derivados da truncal, com a adição de derivados mesenquimais, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células musculares lisas. A diferenciação dessas células é controlada por uma complexa regulação entre fatores solúveis, fatores de transcrição e diferentes componentes de matriz extracelular, separados temporo-espacialmente. As células progenitoras de melanócitos irá migrar lateralmente, entre a ectoderme e o dermomiótomo, diferente dos outros progenitores, que migram ventralmente. Até o momento, não se sabe como é controlada essa mudança da rota ventral para a rota lateral. Para tentar responder essa questão, foi realizado um extenso levantamento bibliográfico, associado a análises em bancos de dados de expressão de proteínas ao longo do desenvolvimento. Essas análises permitiram eleger novas proteínas e mecanismos candidatos ao controle da migração lateral das células da CN. Com essas informações foram elaboradas 4 hipóteses que associassem essas novas proteínas/mecanismos aos dados já descritos sobre esse processo de migração celular. A coerência dessas hipóteses foram testadas *in silico*, utilizando ferramentas de bioinformática e análises em bancos de dados. A ativação do fator de transcrição Lef1, no início da migração lateral, mostrou-se intimamente ligada à expressão de Mitf (controlador master da diferenciação dos melanócitos), conjuntamente a ele, Yin Yang1, poderia atuar como co-fator de transcrição, auxiliando Lef1 a ativar Mitf. Além disso, foram identificados os fatores solúveis Fgf8 e Wnt11 com expressão associada ao momento que as células da CN iniciam sua migração lateral. Esses fatores podem atuar como quimiotático para as células da CN, bem como parecem atuar diretamente na transcrição de Lef1. Esse é o primeiro trabalho que sugere que a ativação na expressão de Fgf8 e Wnt11, em momento específico do desenvolvimento embrionário, seriam os responsáveis pela mudança na rota de migração das células da CN e, conseqüentemente, no início do desenvolvimento dos melanócitos. O melanoma é um dos cânceres com maior taxa de metástase e um dos mais frequentes nos brasileiros segundo o INCA. Entender a biologia dos melanócitos e como se dá a relação entre proteínas envolvidas desde o começo da sua diferenciação pode auxiliar na compreensão dos fenômenos metastáticos das células cancerígenas e criação de novos fármacos.

Palavras-chave: Lef1, diferenciação celular, Mitf, Fgf8, Wnt11, crista neural.

ABSTRACT

Melanocytes are cells originated from the neural crest (CN) and are capable of producing melanin, a protein that helps in the absorption of ultraviolet rays, providing photoprotection for most vertebrates. CN is a population of multipotent cells divided into two large domains, the truncal neural crest, which will give rise to neurons and glial cells of the peripheral nervous system and melanocytes and the cephalic neural crest which will give rise to the same derivatives of the truncal, with the addition of mesenchymal derivatives, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and smooth muscle cells. The differentiation of these cells is controlled by a complex regulation between soluble factors, transcription factors and different extracellular matrix components, separated temporo-spatially. CN cells migrate from the dorsal edges of the neural tube, with the first group migrating along a ventral route, going between the neural tube and the somites, originating the sympathetic ganglia. The second group will migrate ventrally, but now between the sclerotome and the dermomyotome, giving rise to the dorsal root ganglia. The last group of CN cells to migrate will totally change the migration route, starting to migrate between the ectoderm and the dermomyotome, through a lateral route, no longer ventral. These cells will form a large part of the melanocytes. So far, it is not known how this change from the ventral route to the lateral route is controlled. To try to answer this question, an extensive bibliographic survey was carried out, associated with analyzes in protein expression databases throughout development. These analyzes made it possible to elect new proteins and candidate mechanisms to control the lateral migration of CN cells. With these information, 4 hypotheses were developed that would associate these new proteins/mechanisms with the data already described about this process of cell migration. The coherence of these hypotheses was tested *in silico*, using bioinformatics tools and analysis in databases. The activation of the transcription factor Lef1, at the beginning of lateral migration, was shown to be closely linked to the expression of Mitf (master controller of melanocyte differentiation), together with him, Yin Yang1, could act as a transcription cofactor, helping Lef1 activating Mitf. In addition, soluble factors Fgf8 and Wnt11 were identified with expression associated with the moment when CN cells start their lateral migration. These factors can act as a chemotaxis for CN cells, as well as appear to act directly on Lef1 transcription. This is the first study that suggests that activation in the expression of Fgf8 and Wnt11, at a specific moment of embryonic development, would be responsible for the change in the migration path of CN cells and, consequently, in the beginning of the development of melanocytes. Melanoma is one of the cancers with the highest rate of metastasis and one of the most frequent in Brazil according to INCA. Understanding the biology of melanocytes and how the relationship between proteins involved occurs since the beginning of their differentiation can help in understanding the metastatic phenomena of cancer cells and the creation of new drugs

Keywords: Mitf, Lef1, Wnt11, cell differentiation, Fgf8, neural crest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de raposas com produção predominante de eumelanina ou feomelanina	16
Figura 2 – Ilustração das diferentes ondas de migração da CNT	17
Figura 3 – Indução do tubo neural e a expressão de Noggin no lábio dorsomedial do dermomiótomo.....	20
Figura 4 – Primeira onda de migração das células da CNT com os principais genes expressos pelas células da CNT.....	21
Figura 5 – Desenvolvimento dos somitos e a segunda onda de migração das células da crista neural.....	22
Figura 6 – Terceira onda de migração das células da CNT	24
Figura 7 - Mitf ativa a transcrição de proteínas responsáveis pela pigmentação	26
Figura 8 – Ação de Sox10 em Mitf em células da CNT	27
Figura 9 – Ação de Yy1 em Mitf nas células da CNT.....	28
Figura 10 – Ação de Pax3 na ativação de Mitf em células da CNT	29
Figura 11 – Alguns fatores de transcrição responsáveis envolvidos no desenvolvimento de melanócitos.....	30
Figura 12 – Sinalização Notch.....	31
Figura 13 – Representação da expressão de EdnrB e EdnrB2, segundo Harris e colaboradores (2008).....	34
Figura 14 – Expressão de Slit1 e 2 e Robo1 e 2 nos estágios 18HH e 20HH do desenvolvimento	36
Figura 15 – Exemplo de interações proteicas.....	41
Figura 16 – Proteínas promissoras como candidatas a participar do controle da migração das células CNT pela rota lateral	46
Figura 17 – Representação da expressão de Lef1 durante o desenvolvimento de um embrião de galinha	48
Figura 18 – Ilustração da via Bmp de sinalização e análise da interação entre Smad4 e Lef1	50
Figura 19 – Análise da interação entre Mitf e Lef1	51
Figura 20 – Análise das interações entre FoxD3 e Noggin e FoxD3, Bmp7 e Bmp4	52
Figura 21 – Esquema ilustrado das conclusões da hipótese 1	53

Figura 22 – Representação das hibridizações <i>in situ</i> para Wnt1 e Wnt4 e diferentes receptores de Wnt.....	54
Figura 23 – Análise de interações entre Mitf e Wnt em camundongos e humanos.....	56
Figura 24 – Conclusões da hipótese 2.....	56
Figura 25 – Análise da interação da sinalização Slit/Robo com as proteínas presentes durante a migração das células progenitoras de melanócitos	58
Figura 26 – Análise da interação da sinalização Robo/Slit e Wnt11.....	60
Figura 27 – Principal conclusão da hipótese 3.	61
Figura 28 – Expressão de Fgf8 no dermomiótomo durante o desenvolvimento.....	62
Figura 29 – Expressão de Fgfr1 nas células da CNT.....	63
Figura 30 – Principais conclusões da hipótese 4.	64
Figura 31 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 1.....	66
Figura 32 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 2.....	67
Figura 33 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 3.....	68
Figura 34 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 4.....	69
Figura 35 – Análise da interação de Yy1 com Lef1 e Mitf.....	70
Figura 36 – PCS podem ser atraídas por Fgf8 para migrar	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise das proteínas expressas durante o início da migração dos progenitores de melanócitos.....	45
Tabela 2 – Interações entre Wnts e Robos/Slits	59
Tabela 3 – Interações entre Slits e Bmp/Noggin	60
Tabela 4 – Análise da interação de Fgf8 com Robos, Foxd3, Ednrb e Mitf.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

Bmp	<i>Bone morphogenetic protein</i> (em português: Proteína morfogenética do osso)
CN	Crista neural
CNT	Crista neural truncal
Ctnnb	β -catenina
Cxcl	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> (sem tradução para o português)
Cxcr	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> (sem tradução para o português)
Dct	Deltacromotautomerase
Dkk	<i>Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor</i> (em tradução livre: Inibidor Dickkopf da via de sinalização Wnt)
Edn	Endotelina
EdnrB	<i>Endothelin receptor type B</i> (em português: Receptor de endotelina tipo B)
Eph	<i>Eph receptor</i> (em tradução livre: Receptor Eph)
Ets	<i>Ets proto-oncogene 1, transcription factor</i> (em tradução livre: Fator de transcrição proto-oncogênicos 1)
Fig.	Figura
Fgf	<i>Fibroblast growth factor</i> (em português: Fator de crescimento de fibroblasto)
Fgfr	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> (em português: Fator de crescimento de fibroblasto)
FoxD3	<i>Forkhead box 3</i> (sem tradução para o português)
Fst	Folistatina
Frl	Cripto
Gdf	<i>Growth differentiation factor</i> (em tradução livre: Fator de crescimento e diferenciação)
h	Horas
Hes	<i>Hes family BHL transcription factor</i> (sem tradução para português)
HH	Estágio do desenvolvimento definido por Hamburger & Hamilton
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Igf	<i>Insulin like growth factor</i> (sem tradução para o português)
Lef	<i>Lymphoid enhancer binding factor</i> (sem tradução para o português)
Lrp	<i>Ldl receptor related protein</i> (sem tradução para o português)

Mef	<i>Myocyte enhancer factor</i> (em tradução livre: Fator potencializador de miócitos)
Mitf	<i>Melanocyte inducing transcription factor</i> (em tradução livre: Fator de transcrição indutor de melanócitos)
MSA	<i>Migration staging area</i> (sem tradução para o português)
Ngn	Neurogenina
Nrg	Neuregulina
Nrp	Neuropilina
Oc	<i>Onecut homeobox</i> (sem tradução para o português)
PCS	Progenitores de células de Schwann
Pdgf	<i>Platelet derived growth factor</i> (em tradução livre: Fator de crescimento derivado de trombócitos)
Pitx	<i>Paired like homeodomain</i> (sem tradução para o português)
Pou	<i>Pou class homeobox</i> (sem tradução para o português)
s	Somito
Shh	Sonic hedgehog
Sox	<i>SRY-box transcription factor</i> (sem tradução para o português)
TEM	Transição epitélio mesenquimal
Tcf4	<i>Transcription factor 4</i> (em português: Fator de transcrição 4)
Tfe	<i>Transcription factor binding to IGHM enhance</i> (sem tradução para o português)
Tgfb	<i>Transforming growth factor beta</i> (em tradução livre: Fator de crescimento transformante beta)
TIAB	<i>Title and abstract</i> (em português: Título e resumo)
Tyr	Tirosinase
Tyrp	<i>Tyrosinase related protein</i> (em tradução livre: Proteína relacionada a tirosinase)
UV	Raios ultravioletas
Yy1	Yin Yang1
Wnt	<i>Wingless-int protein</i> (sem tradução para o português)

*Neste trabalho adotamos a regra de nomenclatura de genes e proteínas que é bastante utilizado em revistas científicas. Nomes de proteínas são escritos de maneira regular, enquanto genes são escritos em itálico. Além disso, se nos referimos a genes ou proteínas humanas, todo o nome deve vir em caixa alta. Caso contrário, apenas a primeira letra do nome deve estar em maiúscula.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MELANÓCITOS: SUAS FUNÇÕES E IMPORTÂNCIA	15
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.2.1	Desenvolvimento dos melanócitos	19
1.2.2	As células progenitoras de Schwann - outra origem para os melanócitos	24
1.2.3	Mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de melanócitos	25
1.2.3.1	<i>Fatores de transcrição no desenvolvimento dos melanócitos.....</i>	26
1.2.3.2	<i>Sinalização justácrina no desenvolvimento de melanócitos</i>	30
1.2.3.3	<i>Fatores solúveis no controle da diferenciação dos melanócitos</i>	31
1.3	OBJETIVOS.....	38
1.3.1	Objetivo Geral	38
1.3.2	Objetivos Específicos	38
2	METODOLOGIA.....	39
2.1	CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS.....	39
2.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES DURANTE A MIGRAÇÃO LATERAL.....	39
2.3	PESQUISA DE GENES	40
2.4	ANÁLISE DE INTERAÇÕES PROTEICAS.....	40
2.5	REFINAMENTO DAS ANÁLISE DAS INTERAÇÕES PROTEICAS	41
2.6	CONFECÇÃO DAS IMAGENS.....	42
3	RESULTADOS	43
3.1	PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL PELA ROTA LATERAL	43
3.2	HIPÓTESE 1: O AUMENTO NA EXPRESSÃO DE LEF1 É CAUSADO PELO BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO BMP4 E 7	48

3.3	HIPÓTESE 2: SINALIZAÇÃO MEDIADA POR WNT11 PARTICIPARIA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT PELA ROTA LATERAL.....	53
3.4	HIPÓTESE 3: WNT11, NOGGIN E DKK1 SÃO RESPONSÁVEIS PELA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SLIT1 E 2 E POR FIM, A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.....	57
3.5	HIPÓTESE 4: FGF8 PODE SER QUIMIOATRATIVO PARA AS CÉLULAS DA CNT.....	61
4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÃO.....	72
6	PERSPETIVAS.....	73
7	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

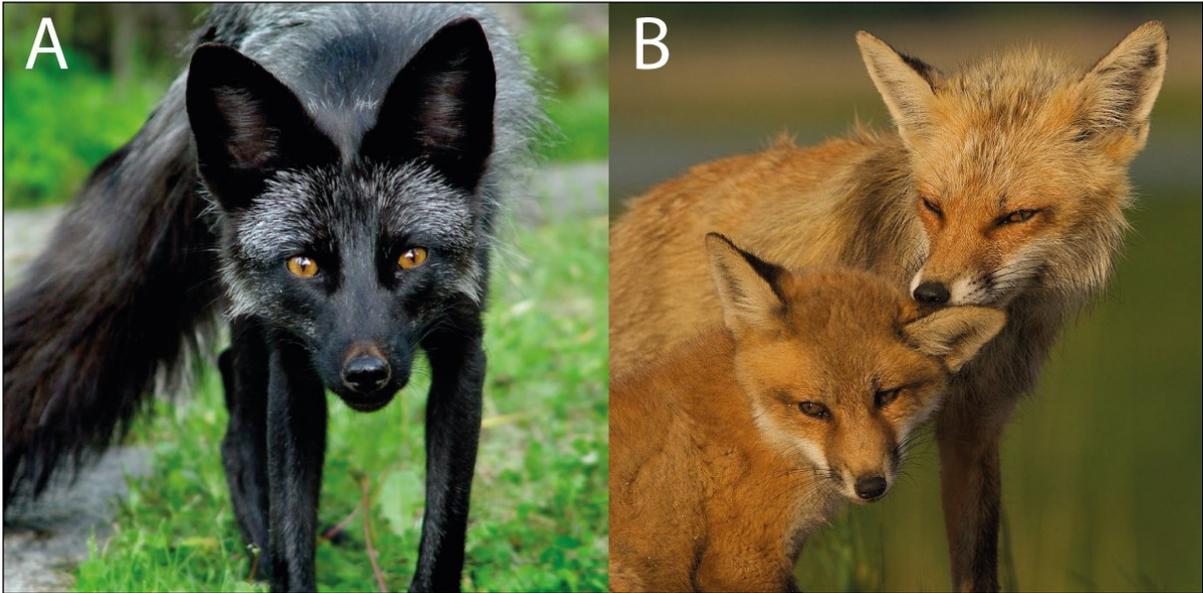
1.1 MELANÓCITOS: SUAS FUNÇÕES E IMPORTÂNCIA

Os melanócitos são células pigmentares que comumente são encontradas na pele, olhos, pelos e penas de vertebrados. Em alguns casos excepcionais podem ser encontrados nas vísceras de algumas espécies (KUKLENSKI, 1915; MAKITA; MOCHIZUKI, 1984; MUROYA et al., 2000). Uma das principais características dos melanócitos é a produção da melanina, uma macromolécula heterogênea e amplamente descrita nos grupos de vertebrados. A melanina é derivada da tirosina, sintetizada pelos melanócitos e muitas vezes transferida para outras células via microvesículas, denominadas melanossomos. Os melanócitos produzem proteínas, como Dopacromo tautomerase (DCT) e Tirosinase (Tyr) que têm a capacidade de proteger contra os raios ultravioletas (UV), apresentam alta capacidade de sobrevivência quando submetidos ao estresse, eles auxiliam na foto proteção e na termorregulação dos vertebrados (LIN; FISHER, 2007; MORT; JACKSON; ELIZABETH PATTON, 2015).

Os melanócitos são capazes de produzir dois tipos de melaninas, a eumelanina que é caracterizada por apresentar um espectro de cores entre marrom e preto, possui efeito fotoprotetor e antioxidante (Fig. 1A). Já a feomelanina é caracterizada por fazer parte do espectro amarelo e vermelho e possuir efeito pró-oxidante (Fig. 1B) (DE LEEUW et al., 2001; MITRA et al., 2012). A mistura de ambas as melaninas formam as diferentes colorações que observamos em mamíferos (SIMON et al., 2009). Contudo, apenas aves e mamíferos expressam a feomelanina (ITO; WAKAMATSU, 2003).

A pigmentação é uma característica comum aos seres vivos, possuindo inúmeras funções, como a proteção aos raios ultravioletas, camuflagem e atração de parceiro para cópula (Fig. 1A-B), entre outros. Os melanócitos são as principais células pigmentares dos vertebrados, são originadas a partir das células da crista neural (CN). A origem evolutiva dos melanócitos nos vertebrados é muito antiga, podendo remontar aos vertebrados mais basais (TRAINOR, 2014)

Figura 1 – Exemplos de raposas com produção predominante de eumelanina ou feomelanina

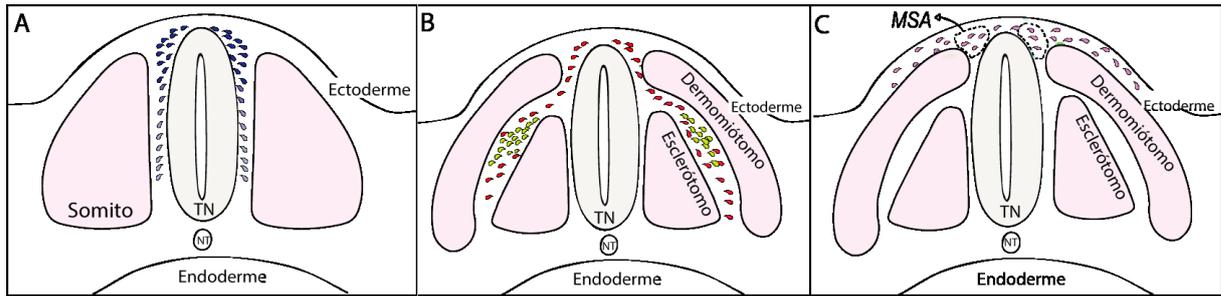


Fonte: <http://animalstime.com/red-fox-mother-and-child/> e <https://imgur.com/t/melanism/pmaV9>.

Nota: (A) Raposa portadora do melanismo, condição em que há uma produção excessiva de eumelanina. (B) Raposas com sua pelagem avermelhada, um exemplo da expressão de feomelanina.

As células da CN formam-se ao longo do eixo ântero-posterior, nos embriões de vertebrados. Durante todo o desenvolvimento, as células da CN são capazes de formar melanócitos, no entanto é na região truncal que essa formação é mais complexa, em partes pela presença dos somitos (LE DOUARIN, 2004). Na região truncal, a primeira população de células sofrerão transição epitélio mesenquimal (TEM) do tubo neural (TN) e migrará perpendicularmente aos somitos, dando origem a derivados neurais que formarão os gânglios simpáticos (Fig. 2A) . A segunda população de células migrará medialmente ao somito, nesse momento, já dividido entre dermomiótomo e esclerótomo (Fig. 2B). A terceira onda de migração das células da crista neural truncal (CNT) sofrerão a TEM e permanecerão 24h na *migration staging area* (MSA) e então migrarão entre a ectoderme e o dermomiótomo dando origem aos melanócitos (Fig. 2C) (BRONNER-FRASER, 1986; VEGA-LOPEZ; CERRIZUELA; AYBAR, 2017).

Figura 2 – Ilustração das diferentes ondas de migração da CNT



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: As diferentes ondas de migração da CNT. (A) Primeira onda de migração das células da CNT darão origem aos neurônios simpáticos. (B) A segunda onda de migração das células da CNT dará origem aos gânglios sensoriais e células gliais (em amarelo) e a terceira onda de células da CNT sairá do tubo neural, permanecerá por 24h na MSA (área pontilhada em C) e então migrará e dará origem aos melanócitos (C). (TN) Tubo neural, (NT) notocorda.

Como observado, as células da CNT que formarão os primeiros melanócitos são as células da CNT que mudam sua rota de migração, passando a migrar por uma rota lateral (Fig. 2C). Mais intrigante ainda é a breve parada dessas células na MSA antes de efetivamente alterar sua rota de migração. Muitos fatores de crescimento e de transcrição já foram descritos como possíveis candidatos a controladores do início da migração das células da CN pela rota lateral e diferenciação inicial dos melanócitos, no entanto as relações entre eles e o efetivo mecanismo de controle é desconhecido.

Evolutivamente, o surgimento da CNé associado à formação das placas ectodérmicas que permitiu a formação de novos órgãos sensoriais. Entretanto, a capacidade da CN adquirir um perfil mesenquimal e migrar extensivamente pelo o corpo do indivíduo é uma característica mais recente dos vertebrados (GANS; NORTH CUTT, 1983). Pesquisadores mostraram que o embrião do tunicado *Ciona intestinalis* apresenta uma crista neural rudimentar, que surge a partir da borda da placa neural e expressa variados genes especificadores da CN, como *Snail*, *Ets* e *FoxD* (IMAI et al., 2006; JEFFERY et al., 2008; RUSSO et al., 2004; TASSY et al., 2010; WADA; MAKABE, 2006). Esses fatores de transcrição especificadores da CN modulam tanto a aquisição de um fenótipo mesenquimal, como a diferenciação de melanócitos presentes no ocelo (JEFFERY; STRICKLER; YAMAMOTO, 2004). Essas estruturas presentes em *Ciona i.* são todas formadas pelas células da CN. Além disso, vários elementos da via de sinalização que controlam a diferenciação dos melanócitos em vertebrados superiores, também estão presentes em anfioxos e urocordados, sugerindo que seja uma característica comum entre anfioxos e

vertebrados (JEFFERY, 2006). Esses dados mostram que a maioria dos elementos da rede regulatória de genes associada à alteração na rota de migração das células da CNT e posterior diferenciação para melanócitos, já estava presente em organismos mais basais e que, muito provavelmente alterações em poucos elementos permitiram a formação dos melanócitos nos vertebrados superiores (BOURLAT et al., 2006).

Nesse trabalho, nós nos propomos a realizar análises teóricas que nos permitam integrar informações como: expressão de fatores de crescimento, expressão, fatores de transcrição, relações evolutivas entre genes, relações regulatórias entre genes, entre outros para responder a questão: Quais seriam os fatores e/ou mecanismos chave que controlam o início da migração das células da CNT pela rota lateral e, conseqüentemente o início do programa de diferenciação dos melanócitos?

Entender a biologia dos melanócitos e quais proteínas são responsáveis pela sua diferenciação e migração ajuda a compreender melhor a natureza de doenças autoimunes como a doença de Waardenburg Tipo II e Tietz, que são causadas por uma mutação nos genes que codificam nos fatores de transcrição *Mitf* e *Sox10*. Nessas doenças é comum a surdez e perda da coloração nos pelos causada pela redução de melanócitos no local (TASSABEHJI et al., 1995). Com as mesmas condições, o albinismo, uma anomalia autossomal, que apesar de haver quantidade normal de melanócitos nos folículos, olhos e pele, há redução ou perda total da biossíntese de melanina. Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA, o câncer de pele é o o mais frequente no Brasil, chegando a 30% dos tumores malignos e o melanoma, neoplasia maligna do tumor, representa 3% deste total. Apesar de uma relativa baixa incidência, o melanoma é o câncer de pele mais grave, por sua alta capacidade de metástase (INCA, 2020). Compreender ainda mais a rede regulatória presente no momento de migração das células progenitoras dos melanócitos auxiliaria a pesquisa no desenvolvimento de novos fármacos para um dos tipos mais agressivos de câncer, os melanomas, pois como esses tumores se originam a partir de melanócitos, possuem uma biologia muito semelhante (BEAUVAIS-JOUNEAU et al., 1999).

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

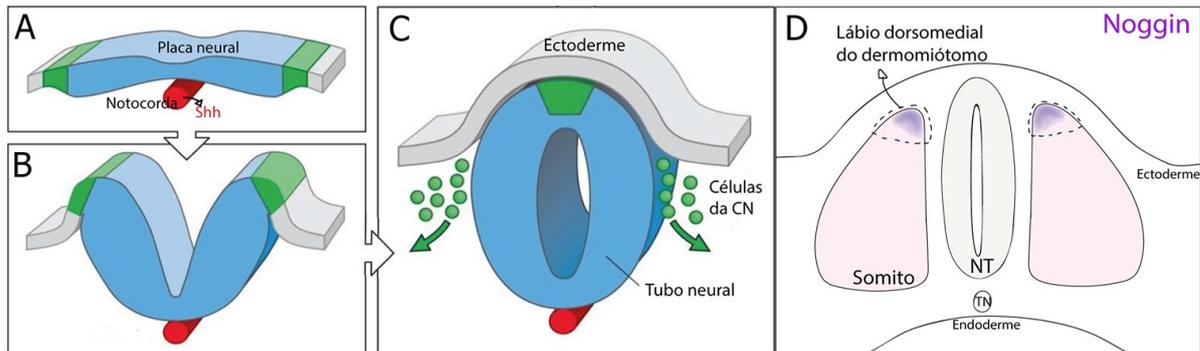
1.2.1 Desenvolvimento dos melanócitos

A CN é conhecida por ser um grupo de células altamente multipotentes que originam ossos, cartilagens (PLATT, 1893) e adipócitos da face (BILLON et al., 2007), gânglios do sistema periférico, cardiomiócitos (TANG et al., 2019) e células pigmentares (LE DOUARIN, 2004). As células da CN delaminam a partir das bordas dorsais do TN e migram ao longo do eixo ântero-posterior do embrião de maneira coordenada temporalmente e espacialmente. A CN pode ser dividida em vários domínios, sendo mais comumente dividida em dois domínios: a CN cefálica que dará origem *in vivo* a progenitores de osteócitos, condrócitos (PLATT, 1983), adipócitos (BILLON et al., 2007), músculo liso (ETCHEVERS; COULY; LE DOUARIN, 2002), neurônios e células gliais periféricas e melanócitos; a CNT, que dará origem *in vivo* a progenitores de neurônios sensoriais, simpáticos, células gliais e melanócitos (DUPIN; CREUZET; LE DOUARIN, 2006; LE DOUARIN, 2004).

A CN é uma população transiente de células que migram a partir de praticamente todo eixo ântero-posterior do embrião dos vertebrados. No fim da gastrulação, através de movimentos morfogenéticos, as bordas da placa neural irão se elevar, formando uma invaginação, denominada de sulco neural (Fig. 3B). Esses movimentos apenas serão possíveis devido aos gradientes dos fatores de crescimento: Bmp (*Bone Morphogenetic Protein*) e Wnt (*Wingless-Int Protein*) presentes na ectoderme não neural e Sonic Hedgehog (Shh), presente na notocorda. O encontro das bordas da placa neural, formará o TN (Fig. 3C). Durante esse processo, a ação de Bmp e Wnt, expresso pela ectoderme, induz as futuras células da CN a expressarem RhoB, Slug e Caderinas de baixa adesão, iniciando o processo de delaminação e migração (AYBAR; MAYOR, 2002; MARCHANT et al., 1998; MAYOR; GUERRERO; MARTÍNEZ, 1997; VILLANUEVA et al., 2002). No entanto, logo nas fases iniciais de migração as bordas dorsais do TN passam a expressar de forma transitória Noggin, um clássico antagonista de Bmp. Essa expressão de Noggin é importante para assegurar as fases iniciais de migração das células da CN, no entanto ela é suprimida em seguida e as células da CNT continuarão a migrar para seus locais de destino. As bordas dorsais do TN voltam a ter contato com Noggin nas fases finais de migração das células da CNT, mas nesse momento o Noggin é expresso pelas células do lábio dorsomedial do dermomiótomo (Fig. 3D, área pontilhada), ou seja, na região do somito mais próxima das bordas dorsais do TN (Fig. 3C)

(SELA-DONENFELD; KALCHEIM, 1999, 2000). A expressão de Noggin no lábio dorsal do dermomiótomo restringe a atuação do Bmp para a região medial do TN (SELA-DONENFELD; KALCHEIM, 2002).

Figura 3 – Indução do tubo neural e a expressão de Noggin no lábio dorsomedial do dermomiótomo



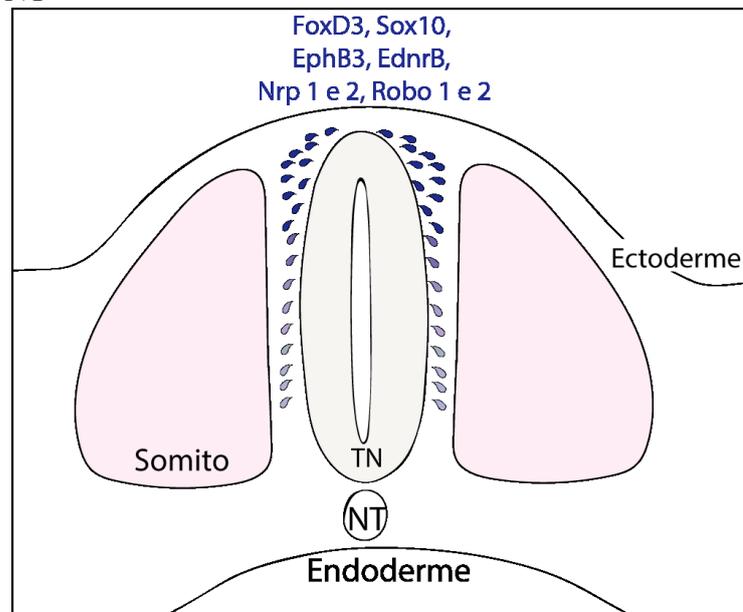
Fonte: Adaptado de WOLPERT; TICKLE, 2011 e produzido pela autora (2020).

Nota: Ilustração de um corte transversal do fechamento do tubo neural. (A) Placa neural em azul, com as bordas da placa neural em verde. Ectoderme não neural expressando Wnt e Bmp em branco. Com a expressão de Shh pela notocorda, em vermelho, as bordas do tubo neural começarão a elevar (B) até o fechamento do tubo neural, que acarretará no começo da migração das células da CN (C). (D) Expressão de Noggin (em roxo) no lábio dorsomedial do dermomiótomo (região pontilhada). (TN) Tubo neural e (NT) notocorda.

Na região cefálica do embrião, principalmente pela ausência de somitos, a CN migra livremente pelo mesênquima, originando diferentes derivados, tanto ectomesenquimal quanto mesenquimal, como os melanócitos. Já as células da CNT migrarão por rotas bem definidas. O fato da somitogênese estar acontecendo concomitante à migração das células da CNT, faz com que o microambiente encontrado pelas células da CNT seja diferente, dependendo do momento em que iniciou sua migração. Esse microambiente dinâmico influenciará a expressão de diferentes fatores de transcrição, impactando diretamente na diferenciação da CNT (GAMMILL; ROFFERS-AGARWAL, 2010; SIMOES-COSTA; BRONNER, 2015). As primeiras células a sofrerem a TEM expressarão FoxD3 (*Forkhead Box D3*) e Sox10 (*SRY-Box 10*), essas células migrarão perpendicularmente ao TN e aos somitos, expressarão simultaneamente receptor de EfrinaB3 (EphB3), receptor de Endotelina B (EdnrB), Neuropilina 1 e 2 (Nrp1 e 2) e Robo1 e 2. Esse conjunto de fatores solúveis e receptores permitirão que essas células diferenciem em neurônios simpáticos (Fig. 4) (TEILLET; KALCHEIM; LE DOUARIN, 1987). Com a diferença temporal entre as primeiras células da CNT que migram e as seguintes, os tecidos embrionários, principalmente os somitos, sofrem

alterações em decorrência do desenvolvimento do embrião, alterando o perfil molecular do microambiente que as próximas células da CNT encontrarão. Isso cria um perfil dinâmico de migração e diferenciação das células da CNT (BAE; SAINT-JEANNET, 2014).

Figura 4 – Primeira onda de migração das células da CNT com os principais genes expressos pelas células da CNT



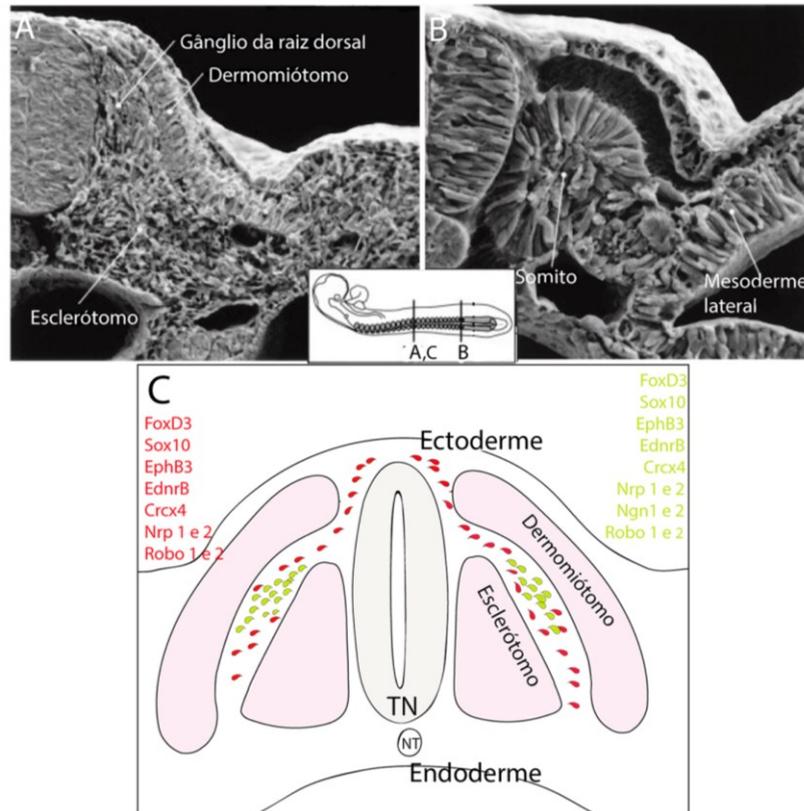
Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Ilustração de um corte transversal de um embrião de galinha, na altura do tronco, demonstrando a primeira onda de migração das células da CNT. Nesse momento, os somitos ainda se encontram em conformação epitelial (para melhor visualização, ver Fig. 5B). Essas células expressam FoxD3, Sox10, EphB3, EdnrB, Nrp1 e 2 e Robo1 e 2 (em azul escuro) ao saírem do TN. Após, a expressão gênica é modulada, passando a expressar genes específicos associados aos tipos celulares que as células da CNT formarão. (NT) Notocorda e (TN) tubo neural.

Os somitos são um elemento chave no controle da migração e diferenciação das células da CNT. Durante a primeira onda migração das células da CNT, os somitos estão em sua conformação maciça epitelial (Fig. 5B). Durante a segunda etapa da migração das células, os somitos já apresentam duas regiões bem distintas, o dermomiótomo, que possui um perfil epitelial localizado na parte dorsal do embrião e o esclerótomo, ventral ao embrião, conhecido por produzir Fgfs (*Fibroblast growth factor*, Fig. 5A). Dentre os Fgfs, o Fgf8 é conhecido por estimular proliferação das células da CNT *in vitro* (CREUZET et al., 2004; SATO et al., 2011). A segunda população de células também expressará FoxD3 e Sox10, porém, migrará entre o dermomiótomo e esclerótomo (STOCKDALE; NIKOVITS; CHRIST, 2000). Essas células, assim como as células da primeira onda de migração, também expressam EphB3, EdnrB, Robo1 e 2, Nrp1 e 2 com a adição do Crcx4. Parte destas células permanecerá entre o

dermomiótomo e esclerótomo, passando a expressar Neurogenina 1 e 2 (Ngn1 e 2), onde formará tanto neurônios, quanto células gliais dos gânglios de raiz dorsal (Fig. 5C).

Figura 5 – Desenvolvimento dos somitos e a segunda onda de migração das células da crista neural



Fonte: Adaptado de Gilbert, 2000 e produzido pela autora (2020).

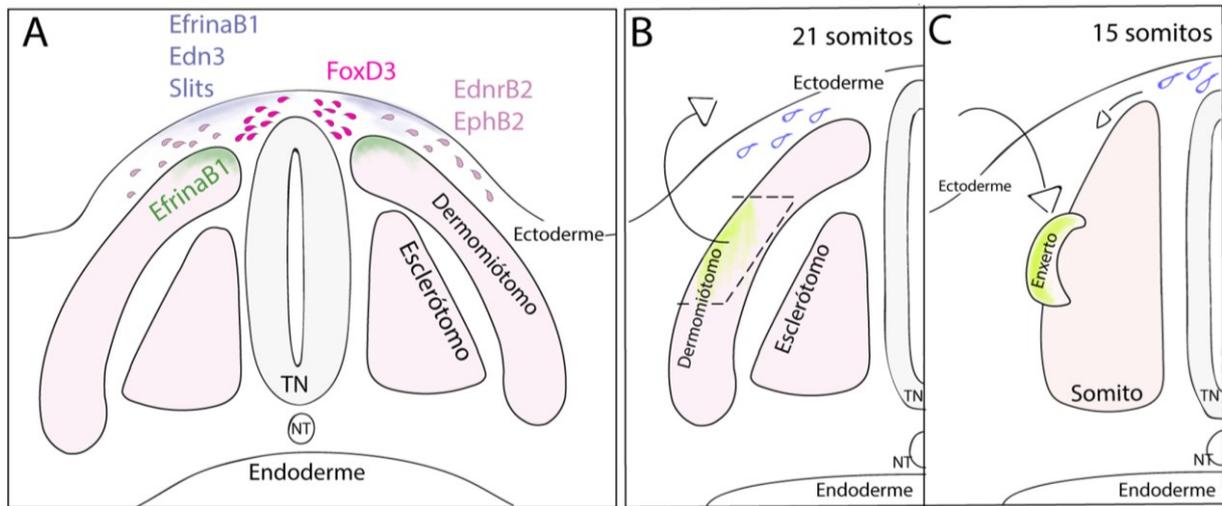
Nota: Microfotografia de um corte transversal em um embrião de galinha. Onde em (A) é possível observar na altura do somito 10, onde já há a divisão em dermomiótomo e esclerótomo (B) Corte transversal na altura do primeiro somito formado. É possível observar o somito em conformação maciça, ver Fig. 4, para ver a ilustração. (C) Ilustração de um corte transversal mostrando a segunda onda de migração das células da CNT. Neste momento o somito já está dividido em dermomiótomo e esclerótomo (como a Fig.5A), permitindo a migração das células da CNT. A segunda onda de células da CNT sairá do TN expressando FoxD3, Sox10, EphB3, EdnrB2, Nrp1 e 2, Robo1 e 2 Crx4. Ao formar o gânglio de raiz dorsal, as células continuarão expressando a mesma assinatura molecular, apenas com a adição de Ngn1 e 2. (NT) Notocorda, (TN) tubo neural.

A última população de células a sair do TN permanecerá na MSA por aproximadamente 24h até, na sua maioria, iniciar sua migração pela rota lateral (entre ectoderme e porção dorsal do dermomiótomo). Ainda não está claro qual o real motivo desta última população permanecer na MSA, Harris e colaboradoras (2008) propõe que a permanência das células da CNT na MSA é fundamental para iniciar a expressão de EdnrB2 (*Endothelin Receptor Type B2*) e assim conseguir migrar entre a porção dorsal do dermomiótomo e a ectoderme. Após permanecerem 24h na MSA, a expressão de FoxD3 será

silenciada e as células da CNT passarão a expressar os receptores de EfrinaB2 (EphB2) e EdnrB2. A partir disso, as células da CNT migrarão entre o dorso do dermomiótomo que estará expressando EfrinaB1 e a ectoderme que expressará Slit, Endotelina3 (Edn3) e EfrinaB1 (Fig. 6A). A migração das células da CNT pode ser guiada através da expressão de fatores a curta distância. Entretanto, o último estágio de migração, pela rota dorsolateral, as células parecem ser orientadas a longa distância, durante o desenvolvimento dos somitos.

Enquanto as células da CNT permanecem na MSA, na região central do dermomiótomo começa a TEM (19-20 somitos) cerca de 6-12 horas antes das células da CNT entrarem na rota dorso lateral (SANTIAGO; ERICKSON, 2002). A TEM das células do dermomiótomo ocorre numa posição relativamente distante do ponto de entrada das células da CNT na rota dorso lateral (300-500 μ m). Ou seja, a estrutura do dermomiótomo por onde as células da CNT iniciarão a migração pela rota lateral permanece íntegra, mas os fatores solúveis que estimulam a TEM das células do dermomiótomo poderiam influenciar as células da CNT que estão na MSA (Fig. 6B-C). Tosney (2004) observou que apesar da distância, quanto essa região central do dermomiótomo de um embrião mais velho era transplantado para um embrião mais jovem, as células da CNT migravam precocemente pela rota dorso lateral, entre a ectoderme e o somito (Fig. 6B). Este estímulo não ocorreria devido à interação célula-célula, já que o implante está localizado na região distal do somito e as células estariam localizadas a pelo menos 600 μ m de distância do implante, no lábio dorsal do dermomiótomo (Fig. 6C). A autora concluiu que os fatores liberados no microambiente seriam responsáveis por atrair, através da difusão, as células da CNT a migrarem pela rota lateral. Em decorrência do tamanho da derme enxertada no local, as células da CNT que já haviam migrado pela rota ventral conseguem retomar à rota lateral, mostrando que algumas células mesmo que já tenham migrado, conseguem detectar e responder aos fatores liberados (TOSNEY, 2004). No entanto, ainda não são conhecidos o fator ou os fatores responsáveis por atrair as células da CNT.

Figura 6 – Terceira onda de migração das células da CNT



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: (A) Na terceira onda de migração, as células da CNT saem do TN expressando FoxD3, porém, permanecem por 24h na MSA até os níveis de FoxD3 (em rosa) diminuírem e então começam a expressar EdnrB2 e Ephb2 ao migrar entre o dermomiótomo, que expressa EfrinaB1 (em verde), e a ectoderme que expressa EfrinaB1, Edn3 e Slits (em azul). (B) Experimento em que Tosney, 2004 retira parte do dermomiótomo, expressando fatores desconhecidos (em amarelo) de um embrião de galinha mais velho implanta em um embrião mais novo (C), fazendo com que as células, que deveriam migrar pela rota ventral, migrem pela rota lateral. (NT) Notocorda, (TN) tubo neural.

1.2.2 As células progenitoras de Schwann - outra origem para os melanócitos

Até 2009 acreditava-se que os melanócitos provinham apenas das células da CNT que migram pela rota lateral, expressando EdnrB2. Entretanto, Adameyko e colaboradores (2009) mostraram que uma grande parte dos melanócitos da pele são formados por células da CNT que migraram pelas rotas ventrais, mas mantiveram-se indiferenciadas, associadas aos nervos periféricos em desenvolvimento, chamados, originalmente, de progenitores de células de Schwann – PCS. Essas células são progenitores multipotentes que são Sox10⁺ e Krox20⁻ e estão associadas aos nervos periféricos. Uma fina regulação entre Neuregulinas (Nrg), ErbB3 (*Erb2 Receptor Tyrosine Kinase 3*), *Insulin-Like Growth Factor 1* (Igf1) *Platelet-Derived Growth Factor* (Pdgf) faz com que essas células diferenciem para melanócitos. As células de Schwann que apresentam Krox20⁺, normalmente não tornam-se melanócitos, porém, essas células permanecem com a potencialidade de diferenciação (ADAMEYKO et al., 2009).

Embora grande parte dos vertebrados apresentem células da CNT que migram e diferenciam de forma tradicional, há exceções, como a galinha silky japonesa que além de possuir polidactilia e lobos das orelhas azuis, apresenta também uma hiperpigmentação

dermal e visceral, diferente de outras raças de galinhas (KUKLENSKI, 1915; MAKITA; MOCHIZUKI, 1984; MUROYA et al., 2000). A pigmentação ectópica é causada pelas células progenitoras de melanócitos, que migram tardiamente do TN, seguem pela rota lateral e então dispersam pela rota ventral, onde permanecem perto da aorta dorsal, na mesoderme intermediária e no mesentério em desenvolvimento (FARACO et al., 2001; REEDY; FARACO; ERICKSON, 1998). A migração incomum e tardia das células da CNT pode estar correlacionada com a falta de condroitin sulfato 6 e dissacarídeos presentes no local, já que em experimentos mostram que onde há presença de açúcar não há a migração de melanoblastos (OAKLEY et al., 1994; OAKLEY; TOSNEY, 1991), hipotetizando assim, que a pigmentação anormal das galinhas silky japonesas pela rota ventro lateral seja por falta de açúcares que antes restringiam a migração (FARACO et al., 2001). Contudo, ainda não há evidências de quais açúcares estão presentes no local. Todos estes dados são anteriores à descoberta das PCS, o que leva a inferir que caso as pesquisas fossem realizadas atualmente, talvez fosse observado que as responsáveis pela pigmentação interna das galinhas silky japonesas sejam as PCS, já que essas são capazes de migrar pelos nervos até encontrar um estímulo para diferenciar em melanócitos.

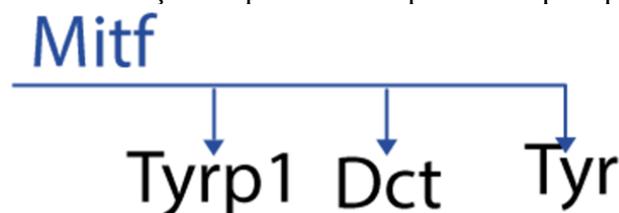
1.2.3 Mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de melanócitos

Os melanoblastos, precursores dos melanócitos, são originados pelas células da CN e são responsáveis pelos diferentes padrões de pigmentação que observamos em vertebrados. Estas células podem ser originadas por duas populações distintas da CNT: a que migra pela rota ventral e origina as PCS e as células que migram pela rota lateral e originam os melanócitos (ADAMEYKO et al., 2009; JASRAPURIA-AGRAWAL et al., 2014; LE DOUARIN, 2004). Para uma célula progenitora adotar um fenótipo específico, como melanócito, são necessárias múltiplas regulações entre fatores de transcrição, que são produzidos pelas próprias células e atuam na expressão gênica; fatores solúveis, que são mais comumente secretados pelas células adjacentes e conjuntamente com a matriz extracelular modulam a expressão das células, criando um microambiente favorável para a diferenciação celular. Por último, a sinalização justácrina, na qual a sinalização ocorre por receptores acoplados em células distintas e ao entrarem em contato com outras células, irão iniciar uma cascata de sinalização dentro da células e modular a mesma.

1.2.3.1 Fatores de transcrição no desenvolvimento dos melanócitos

Os fatores de transcrição são as proteínas que controlam a expressão gênica sendo, portanto, responsáveis pelo desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e diferenciação das células da CN. O *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) foi primeiramente descrito em 1942 por Paula Hertwig, ela identificou esse gene estudando um camundongo mutante que apresentava coloração branca, microftalmia e surdez (HERTWIG, 1942). Análises posteriores mostraram que Mitf pode ser encontrado em vários outros organismos em formas ortólogas, sempre associado ao desenvolvimento dos progenitores de melanócitos, provindos da CN (LISTER et al., 1999; OPDECAMP et al., 1997). Estudos *in vitro* mostraram que Mitf regula diretamente a expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese da melanina, tal como a Tirosinase, *Tyrosinase Related Protein 1* (Tyrp1) e a Dopacroma tautomerase (Fig. 7). O Mitf também parece estar relacionado à regulação de proteínas que atuam no ciclo celular, sobrevivência das células, replicação e reparo do DNA, proliferação celular e mitose (CHELI et al., 2010; LEVY; KHALED; FISHER, 2006; STRUB et al., 2011; VACHTENHEIM; NOVOTNA; GHANEM, 2001; WEBSTER et al., 2014). Toda a polivalência do Mitf se dá pelos diferentes níveis de atividade desse fator de transcrição. Tudo isso é apenas possível pois outros fatores de transcrição atuam regulando Mitf de forma positiva, negativa ou ainda por modificações pós traducionais, como sumoilação ou fosforilação (SEBERG; VAN OTTERLOO; CORNELL, 2017).

Figura 7 - Mitf ativa a transcrição de proteínas responsáveis pela pigmentação



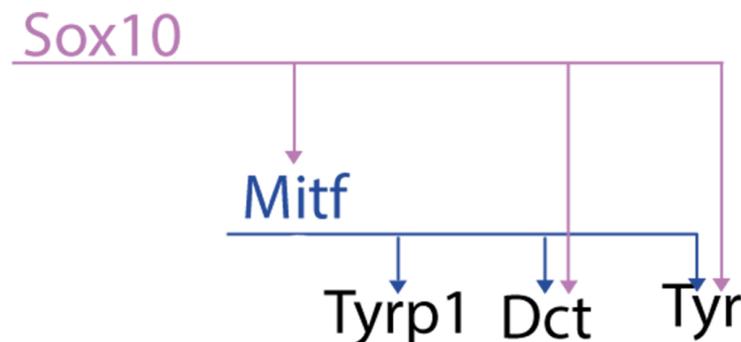
Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Mitf é responsável por ativar a transcrição de proteínas responsáveis pela pigmentação: Tyrp1, Dct, Tyr.

Outro fator de transcrição importante para a diferenciação dos melanócitos é o Sox10. Ele faz parte de uma família de mais de 30 fatores de transcrição, onde os membros Sox8, Sox9, e Sox10 são expressos na especificação da CN e durante a diferenciação de derivados específicos da CNT (KAPUR, 1999; SOUTHARD-SMITH; KOS; PAVAN, 1998). O Sox10,

mais precisamente, atua na manutenção e proliferação das células da CN, assim como na especificação de melanócitos ativando a expressão de *Mitf* (SEBERG; VAN OTTERLOO; CORNELL, 2017). Em outras espécies de vertebrados, como em peixes zebra, quando *Sox10* sofre determinada mutação, os indivíduos apresentam uma redução de progenitores de melanócitos. Essa redução ocorre devido à uma falha na migração e especificação das células da CNT, que posteriormente leva à apoptose dessas células (DUTTON et al., 2001; KELSH; EISEN, 2000). Já em ratos, a mutação *Dominant Megacolon* no *Sox10* em homozigose leva a um estado letal; quando expresso de forma heterozigótica, apresenta a pelagem branca na região abdominal, perda de gânglios entéricos e neurônios derivados da CN cranial (HERBARTH et al., 1998; HOU; ARNHEITER; PAVAN, 2006). Yang e colaboradores (2014) mostraram que a expressão forçada de *Sox10* não é suficiente para reprogramar fibroblastos humanos e de camundongos, mas a expressão forçada de *Sox10* em conjunto com *Pax3* ativa *Mitf* e é capaz de produzir melanócitos (Fig. 8).

Figura 8 – Ação de *Sox10* em *Mitf* em células da CNT



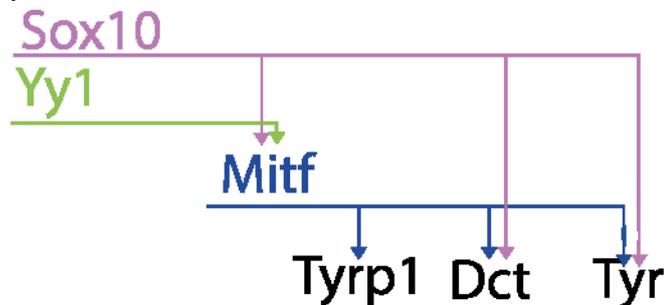
Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: *Sox10*, em rosa, um dos principais ativadores de *Mitf*, *Dct* e *Tyr*, nas células da CNT.

Ying Yang 1 (*Yy1*) é uma proteína descrita no começo dos anos 90, capaz de atuar como fator de transcrição, fator de repressão e como iniciador, ligando-se à proteína que inicia a transcrição de genes alvo. Por possuir esse perfil multifuncional e adaptável, que *Yy1* recebeu este nome e é capaz de interagir com diferentes proteínas (SHI; LEE; GALVIN, 1997). Camundongos *knockout* para *Yy1* apresentavam completa ausência de melanócitos nos folículos, causando uma descoloração precoce nos pelos após a primeira prole (LI et al., 2012). Li e colaboradores (2012) mostram que isto ocorre pois *Yy1*, normalmente, interage

fortemente com a região b-HLH-Zip de *Mitf* para ativar a diferenciação de melanócitos, logo, a *Yy1* seria um dos responsáveis pela ativação de *Mitf* (Fig. 9).

Figura 9 – Ação de *Yy1* em *Mitf* nas células da CNT

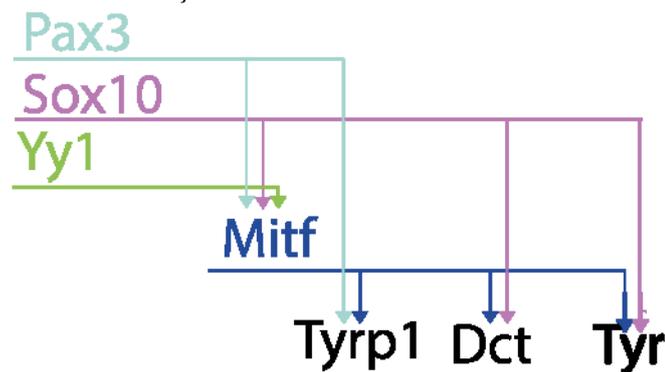


Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Fator de transcrição *Yy1* em verde é capaz de interagir com a região b-HLH-Zip de *Mitf*.

A família de fatores de transcrição Pax possui 9 membros, todos extremamente conservados nos vertebrados. Esses fatores de transcrição atuam fortemente durante o desenvolvimento embrionário e na indução e diferenciação da CN, principalmente os membros *Pax3* e *Pax7*, que são expressos no dorso do TN (MONSORO-BURQ, 2015), sendo *Pax3* o mais estudado no desenvolvimento e diferenciação da crista neural e melanócitos. Esse fator de transcrição é responsável pelo fechamento do TN, atuando via inibição de p53, mediadora da apoptose (PANI; HORAL; LOEKEN, 2002), é capaz de modular *Tyrp1* (GALIBERT et al., 1999) e reprimir a expressão de *Dct* quando não há β -catenina fosforilada no sistema (LANG et al., 2005). Já sua super expressão induz a produção de tirosinase em embriões de ascídias (YAJIMA et al., 2003). A ação de *Pax3* na ativação de *Mitf* ainda parece ser controversa, já que pesquisadores mostraram que *Pax3* interage fracamente para transativar o promotor de *Mitf* ou ainda que *Pax3* atuaria sinergicamente com *Sox10* para transativação de *Mitf* (BONDURAND et al., 2000; POTTERF et al., 2000; WATANABE et al., 1998), porém, dados mostram também que *Pax3* não atua conjuntamente com *Sox10* (LEE et al., 2000)(Fig. 10). Camundongos heterozigotos para *Pax3 e 7* ou que possuíam mutações em *Pax3* apresentaram problemas de pigmentação da pele e pelos, já mutação em homozigose em *Pax3* não é compatível com a vida (HAUSWIRTH et al., 2012; MINCHIN; HUGHES, 2008; REISSMANN; LUDWIG, 2013)

Figura 10 – Ação de Pax3 na ativação de Mitf em células da CNT



Fonte: Produzido pela autora (2020).

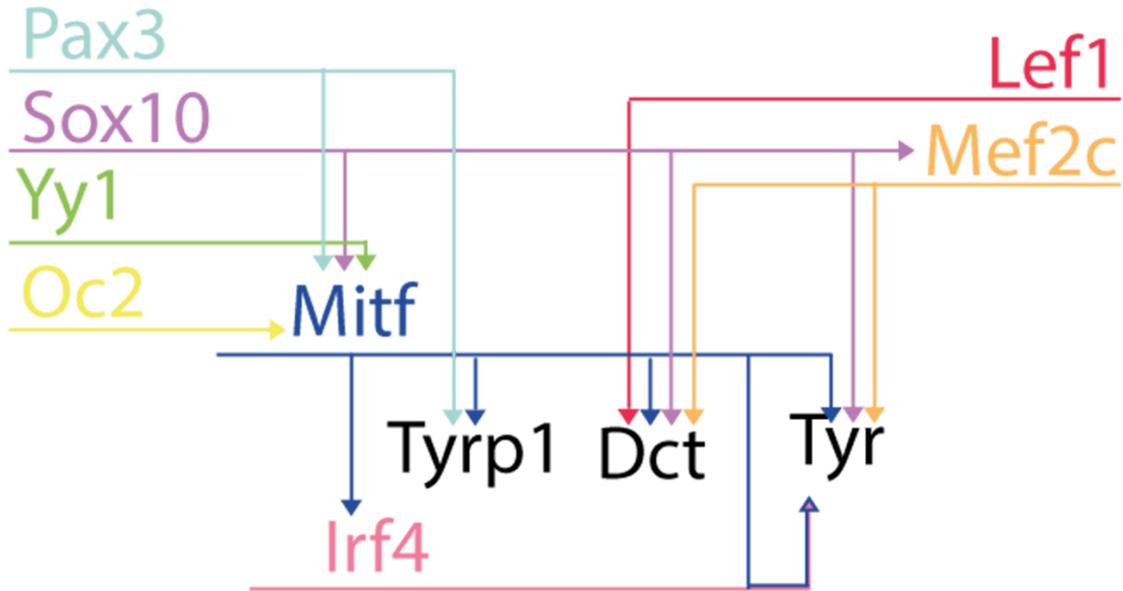
Nota: Pax3 é um dos ativadores de da transcrição de Mitf e Tyrp nas células da CNT.

O fator de transcrição FoxD3 é expresso no dorso do TN pelas células pré-migratórias em progenitores neurais da CNT (KOS et al., 2001). A expressão de FoxD3 é extremamente importante para a temporalidade e regulação da CNT, já que este fator de transcrição seria o responsável por coordenar diferenciação entre progenitores neurais e melanócitos (THOMAS; ERICKSON, 2009), visto que em experimentos *in vitro*, o bloqueio de FoxD3 aumenta a diferenciação de melanócitos e atua na migração precoce das células da CNT pela rota dorso lateral. Dados mostram que FoxD3 impede a ligação de Pax3 no sítio promotor de *Mitf*, reprimindo assim a sua expressão (KOS et al., 2001).

Outros fatores de transcrição, como Lef1, Mef2C, Oc2, Irf4 não possuem muitos estudos relacionando-os com à diferenciação da CN, entretanto, dados mostram que participam na diferenciação de melanócitos, atuando de forma direta ou indiretamente na ativação de Mitf. *Lymphoid Enhancer-binding Factor1* (Lef1) é um fator de transcrição membro da família *T-cell specific factor* (Tcf) no qual é ativado por β -catenina e atua na expressão de Dct (LOVE et al., 1995). Já o Mef2C, *Myocyte enhancer transcription factor*, é um fator de transcrição importante no desenvolvimento do coração, sistema nervoso central e craniofacial (BLACK; CRIPPS, 2010; POTTHOFF; OLSON, 2007) e o silenciamento desta proteína leva a redução de melanócitos, causando perdas severas da pigmentação devido à perda da expressão de Mitf e Dct (SIMOES-COSTA; BRONNER, 2015). Gammil e Roffers-Agarwal (2010) descrevem que *Mef2C* é um dos genes alvos de atuação de Sox10, que quando transcrito, Mef2C atua como co-fator de transcrição com Sox10 para retroalimentar-se e ativar seus diferentes alvos, como genes relacionados ao desenvolvimento de melanócitos e de neurônios do sistema nervoso periférico. *Onecut2*, Oc2, é um fator de transcrição que faz parte da classe de proteínas homeóticas (LANNON et al., 1998). Jacquemin e colaboradores

(2001) mostraram que este fator de transcrição é capaz de se ligar no sítio promotor de *Mitf*, sua super expressão estimula a atividade do promotor de *Mitf*, assim como mutações que previnem a ligação de *Oc2*, diminui a atividade do promotor de *Mitf* em 75% (JACQUEMIN et al., 2001) (Fig. 11).

Figura 11 – Alguns fatores de transcrição responsáveis envolvidos no desenvolvimento de melanócitos



Fonte: Produzido pela autora (2020).

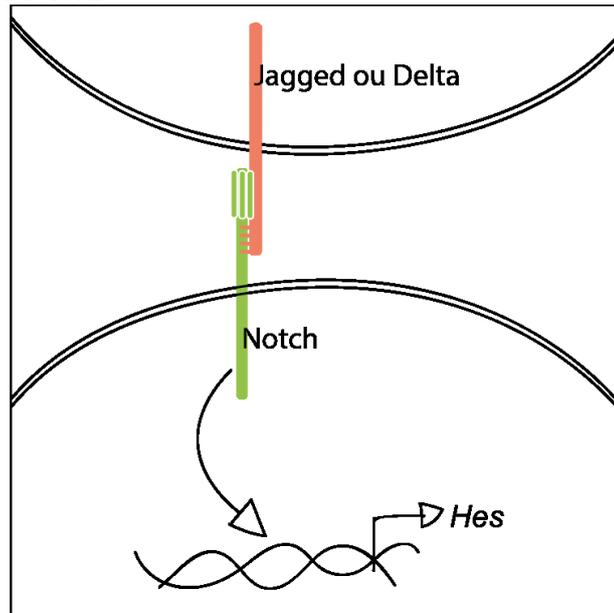
Nota: Alguns dos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento de melanócitos. *Lef1*, *Mef2c* parecem atuar na ativação de *Dct* e *Tyr*. Já *Irf4* é induzido por *Mitf* e ambos ativam a expressão de *Tyr*.

1.2.3.2 Sinalização justácrina no desenvolvimento de melanócitos

A família de receptores Notch possui 4 membros, Notch 1-4, são proteínas transmembranares que atuam através da interação célula-célula e estão presentes durante o desenvolvimento, na diferenciação celular, no câncer e na senescência (HOARE; NARITA, 2018; ITO; HOARE; NARITA, 2017). Em mamíferos, os receptores Notch possuem 5 principais ligantes: Jagged 1 e 2 e Delta 1, 3 e 4. A sinalização Notch é ativada por uma ligação extracelular através de um de seus ligantes, então o domínio intracelular do receptor Notch será clivado e translocado até o núcleo, para que com outras proteínas coordenem a transcrição do gene alvo (Fig. 12). Um desses genes é o *Hes* (*Hairy enhancer of split*), que codifica o fator repressor de mesmo nome e coordena a diferenciação de diferentes tipos celulares (KAGEYAMA; OHTSUKA; TOMITA, 2000), como de melanoblastos, atuando na

sobrevivência destes (MORIYAMA et al., 2006). Schouwey e colaboradores (2007) demonstraram que os receptores Notch 1 e 2 e c-Kit agem conjuntamente durante o desenvolvimento embrionário. Já durante a fase adulta, Notch 1 e Notch 2 atuam em dose dependente e são indispensáveis para a manutenção dos melanócitos.

Figura 12 – Sinalização Notch



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Ilustração da sinalização Notch. Através do contato célula-célula, Notch interage com um dos seus receptores, Delta ou Jagged e assim são capazes de ativar a transcrição de genes alvo, como *Hes*.

1.2.3.3 Fatores solúveis no controle da diferenciação dos melanócitos

Os receptores de endotelina fazem parte do grupo receptores acoplados à proteína G, possuindo sete domínios transmembranares (PLA; LARUE, 2003) e são divididos em 3 classes, EdnrA, EdnrB e EdnrC. Seus ligantes, as Endotelinas (Edn) são proteínas com o tamanho de cerca de 21 aminoácidos. Atualmente há 3 membros de endotelinas descritas, a Edn1, Edn2 e Edn3, com sua maior incidência na CN, a Edn3 (LECOIN et al., 1998). A distribuição da Endotelina e seus receptores nas espécies estão fortemente ligadas à atração entre proteína-receptor. Como por exemplo, EdnrA possui afinidade com Edn1 e Edn2 e este já foi bem descrito em galinhas, *Xenopus* e vários mamíferos, inclusive o homem. Já o EdnrB já foi descrito em humanos, vacas e parcialmente em peixes zebra. Entretanto, há um segundo subtipo de EdnrB, chamado de EdnrB2, que até 2002 era apenas descrito em aves (PLA et al.,

2005), porém Akiyama e colaboradores (2002) mostraram que peixes do gênero *Oryzias* também expressam esse receptor (AKIYAMA, 2002)

EdnrB é expresso na parte dorsal do TN truncal, antes das células realizarem a TEM, diferente das células da crista neural cefálica, que expressam EdnrA depois de migrarem do TN. Todas as células pré-migratórias da CNT expressam EdnrB e apenas as células que irão entrar na rota ventral continuarão expressando o receptor, ou seja, células adrenomedulares e células dos gânglios periféricos e entéricos (NATAF; LE DOUARIN, 2000). Em aves, o EdnrB presente nas células que estão na MSA precisa sofrer uma redução e então o EdnrB2 passa a ser expresso nas células que começarão a migrar pela rota lateral (Fig.13) (LECOIN et al., 1998).

O EdnrB2 foi descrito em 1998 por Lecoin e colaboradores, esses autores demonstraram que EdnrB2 possui afinidade igualmente por todas as endotelinas já supracitadas, mostrando que Edn1-3 podem ser igualmente importantes para o desenvolvimento e migração das células da CNT. Pla e colaboradores (2005) mostraram que ao forçar a expressão de EdnrB2 exógeno, as células da CNT migraram normalmente pela rota lateral, não aumentando a velocidade de migração durante as primeiras horas. Eles mostram também que não é necessária a expressão de fatores de transcrição como *Mitf* para as células migrem pela rota lateral. As células da CNT só expressarão esse fator de transcrição quando já estiverem na rota lateral. Harris e colaboradoras (2008) mostraram que o EdnrB2 é expresso ainda enquanto as células estão na MSA, especulando que este receptor seja o responsável pela migração das células da CNT pela rota lateral, visto que ao bloquear o receptor EdnrB2 ou EphB2, ocorre uma diminuição dos progenitores de melanócitos na migração lateral. Contudo, ao forçar a expressão de EdnrB2 ou de EphB2 no momento de migração ventro-lateral, há a migração ectópica de células da CNT para a rota lateral, porém parte dessas células não expressaram marcadores de melanoblastos. Segundo as autoras, a superexpressão de EdnrB2 mostrou que é necessário que a célula possua uma quantidade maior de EdnrB2 para que ela migre pela rota lateral, independente de ser melanoblasto, como estudos anteriormente já haviam mostrado (ERICKSON; GOINS, 1995).

Na região vagal do embrião de aves (1-7 somitos) há duas ondas de migração das células da CNT pela rota lateral (REEDY; FARACO; ERICKSON, 1998). A primeira ocorre no estágio 10 Hamburger & Hamilton (HH), quando as células migram do TN pela rota lateral para povoar os arcos branquiais e o coração (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Já a

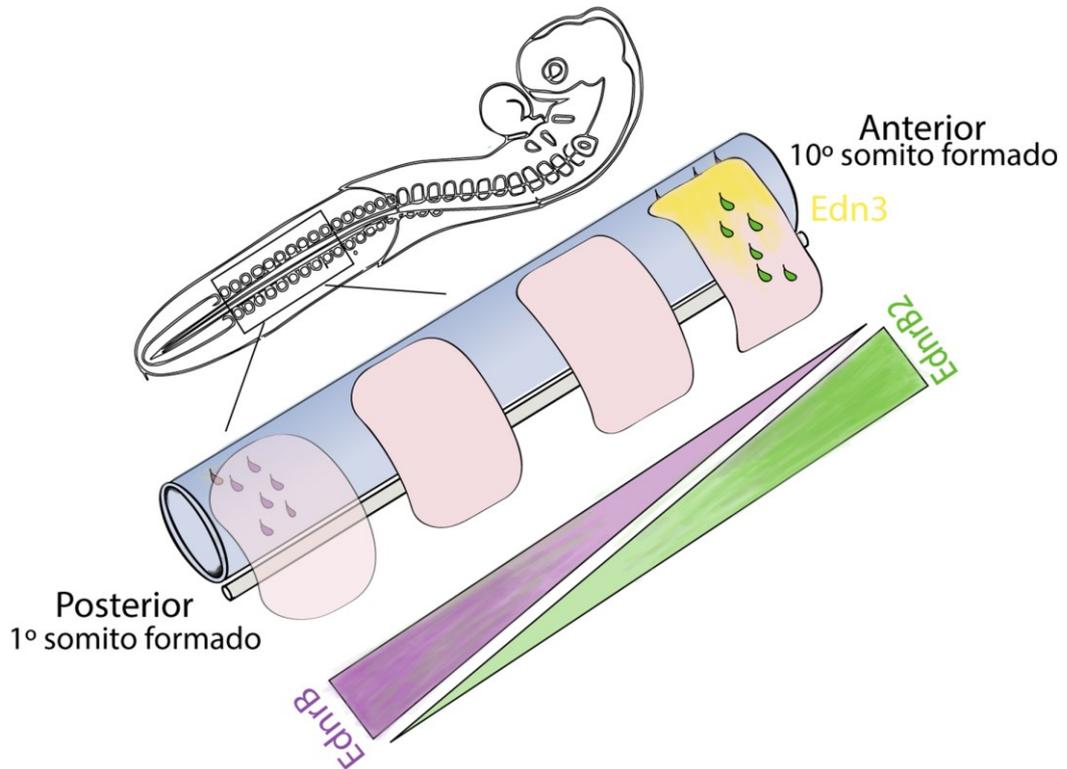
segunda, acontece em 18 HH e dará origem aos melanoblastos (KURATANI; KIRBY, 1991; REEDY; FARACO; ERICKSON, 1998).

Considerando que ambos os grupos de células da CN migrassem pela mesma rota, Harris e colaboradoras (2008) supuseram que ambas as populações de células possuem o mesmo mecanismo molecular. Porém, através de hibridizações *in situ*, foi observado que EdnrB2 só estava presente durante a segunda onda de migração, em 18HH. Entretanto a primeira onda de células expressava EdnrB, o que levou as pesquisadoras a inferir que é necessário uma subexpressão de EdnrB para que EdnrB2 (Fig. 13) nos progenitores de melanócitos e assim migrem pela rota lateral, desta forma, apenas progenitores de melanócitos expressariam EdnrB2, segundo sua hipótese. No entanto na primeira onda de migração, no estágio de desenvolvimento 10HH, o embrião possui apenas os primórdios dos somitos, fazendo com que talvez não haja o estímulo necessário para a expressão do EdnrB2. Estudos mostram que ao fazer o transplante de uma parte do TN adjacente aos somitos 1 a 3, onde as células da CN ainda não migraram, para um embrião mais velho, num local onde as células estão começando a migrar (10-11 somitos), as células provindas do TN de 1-3 somitos irão migrar pela rota lateral, mostrado mais uma vez que o ambiente e a temporalidade são fatores importantes para a definição de quais rotas as células devem tomar (HARRIS; HALL; ERICKSON, 2008).

Uma das proteínas ligantes do receptor B2 é a Endotelina 3 (Et3/Edn3). Esta é uma proteína da família das endotelinas e está relacionada a diferentes funções biológicas, como no auxílio na vasoconstrição. A Edn3 é uma proteína com 21 aminoácidos conhecida por ligar em diferentes receptores, como o EdnrB. A Edn3 é expressa na ectoderme e no dermomiótomo com o EdnrB2 no momento da migração dos progenitores de melanócitos (NAGY; GOLDSTEIN, 2006) e atua também na proliferação e sobrevivência dos precursores de melanócitos e células gliais. *In vitro*, Edn3 atua como um fator mitótico e tem a capacidade de estimular a diferenciação das células da CNT em melanócitos (LAHAV et al., 1996). A Edn3 tem uma forte atuação na CNT, visto que quando utilizada em culturas com melanócitos, esses voltam a seu estado indiferenciado (DUPIN et al., 2003). Pela Edn3 possuir uma robusta atuação na CN, foi suposto que ela poderia atuar como agente quimiotático, assim como EphB2, que apresentam características quimioatrativas para a CN (SANTIAGO; ERICKSON, 2002). Entretanto ao realizar experimentos *in vitro*, Harris e colaboradoras (2008) observaram que a migração de melanoblastos não era diferente de quando utilizado apenas meio de cultura, concluindo assim, que Edn3 não é quimioatrativo

para o EdnrB2. Em outras espécies, como em *Xenopus laevis*, a Edn3 também não é quimioatrativa para as células, porém, ela atua apenas na viabilidade das células, fazendo com que elas invadam o local e auxiliem na diferenciação de melanócitos (KAWASAKI-NISHIHARA et al., 2011).

Figura 13 – Representação da expressão de EdnrB e EdnrB2, segundo Harris e colaboradores (2008)



Fonte: Produzido pela autora (2020).

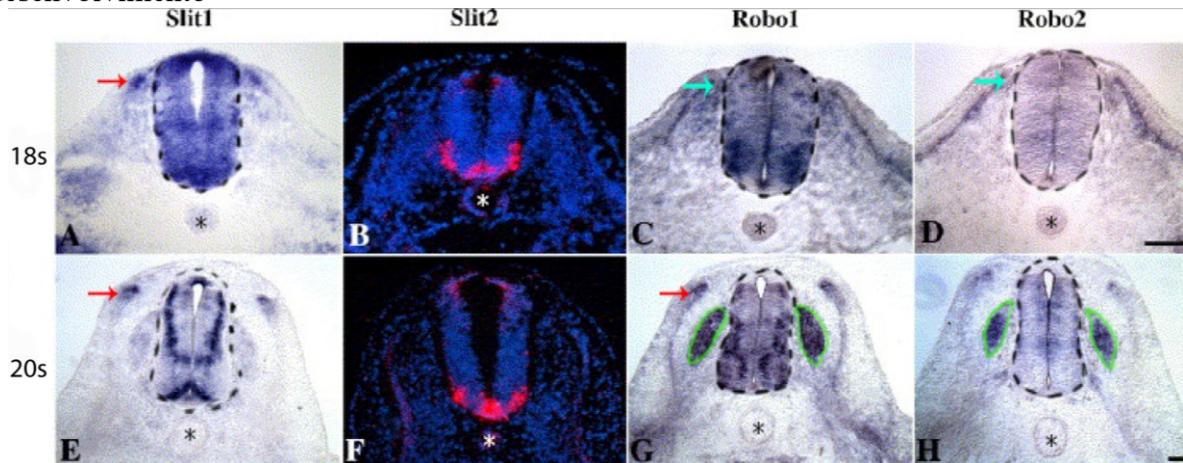
Nota: Representação da expressão de EdnrB e EdnrB2 ao longo do desenvolvimento do embrião. Reprodução de um tubo neural e notocorda (em azul), mostrando a migração ventral na região posterior do embrião. As primeiras células que estão migrando na região posterior, segundo Harris e colaboradoras (2008), possuem um alto nível de EdnrB. Com 10 somitos, na região anterior ao embrião, o somito está expressando Edn3 e as células da CNT já estão migrando pela rota lateral e expressando alto nível de EdnrB2, em verde e baixo nível de EdnrB.

A Slit é uma família de glicoproteínas que possui membros nos vertebrados: Slit1, Slit2 e Slit3. Os genes Slits foram inicialmente descritos em *Drosophila* sp., porém, são extremamente conservados em nemátodos e mamíferos (KIDD; BLAND; GOODMAN, 1999). Assim como seu receptor, Robo, que também possui apenas 3 formas e foi descrito em neurônios de *Drosophila* sp. Robo1 e 2 atuam na orientação de neurônios e estão presentes na CNT (DE BELLARD; RAO; BRONNER-FRASER, 2003) (Fig. 14C-D, 14G-H), enquanto Robo3 suprime a ação de Slit (JEN et al., 2004; SABATIER et al., 2004).

As Slits são secretadas no meio extracelular, onde atuam no desenvolvimento do coração e rins e podem ser quimio repelentes para as células da crista neural, *in vivo* (JIA; CHENG; RAPER, 2005b; LIU et al., 2003; YUAN; LIU, 2003). Entretanto, *in vitro*, menores concentrações de Slit 2 exerce função contrária, as células apresentam maior motilidade comparadas com grupo controle (DE BELLARD et al., 2002). As Slits são expressas em diferentes temporalidades e locais do TN, somitos e células da crista neural (Fig. 14A-B, 14E-F). Ou seja, há uma diferença na expressão de Slits-Robo no momento da transição da migração da CNT pela rota dorso ventral para a migração pela rota lateral. Slit1 é expressa em níveis mais elevados na parte dorsal do dermomiótomo no momento que as primeiras células da CNT estão migrando (Fig. 14A e 14E). Já a Slit2 é expressa na parte mais basal do dermomiótomo em níveis mais reduzidos (Fig. 14B e 14F). Ou seja, no momento em que as células da CNT que darão origem aos progenitores neurais estão migrando do TN e expressando Robo, o lábio dorsal do dermomiótomo estaria expressando Slit, culminando em uma repulsão daquele local, retendo assim, as células apenas na rota dorso ventral (Fig. 14C-D, 14G-H).

Análises quantitativas mostram que no momento em que os progenitores neurais começam a migrar, os níveis de expressão de Robo1 e Slit2 são 15% e 70% menores em relação a migração lateral respectivamente. Já a expressão de Robo3 é constante, criando a hipótese de que a regulação negativa de Robo1 e Slit2 seriam responsáveis pela mudança na migração das células (JIA; CHENG; RAPER, 2005a). Foi observado também que 25% das células da CNT que apresentaram Robo1 inativado através da deleção da parte citoplasmática migraram pela rota dorso lateral normalmente, mesmo com a presença de Slit2, mostrando que a ação de Robo1 é necessária para a repulsão das células e Slit2-Robo1 podem ser importantes para a transição entre a rota ventro lateral e dorso lateral.

Figura 14 – Expressão de Slit1 e 2 e Robo1 e 2 nos estágios 18HH e 20HH do desenvolvimento



Fonte: JIA; CHENG; RAPER, 2005.

Nota: Corte transversal na região dos membros superiores de embriões de galinha, mostrando a expressão de Slits e Robos ao longo do desenvolvimento de galinha. (A,E) Slit1 é expresso no TN e no lábio dorsomedial do dermomiótomo (setas vermelhas). (B,F) Já Slit2 é expresso na base do TN, em vermelho. (C,G) Robo1 é expresso na base do TN, nas células da CNT que estão migrando (seta ciano) e nos gânglios da raiz dorsal (delineado em verde). (D,H) Robo2 é expresso pelas células da CNT (seta ciano) e pelas células do gânglio da raiz dorsal. Notocorta marcado com asterisco (*) e tubo neural pontilhado em preto.

Outro grupo de proteínas que está presentes e parece ser essenciais para a migração das células da CNT são as Efrinas (A1-6 e B1-3) e seus receptores transmembranares Eph (A1-10 e B1-6), conhecidos por serem a maior família de receptores tirosina quinase até o momento, com 16 receptores descritos em vertebrados (KRULL et al., 1997; WANG; ANDERSON, 1997). Algumas dessas proteínas podem atuar à curta distância como repulsoras ou quimiotrativas para as células, dependendo de quais tipos elas expressam. Como por exemplo, o receptor de EfrinaB3 (EphB3) está presente nas células da CNT que migram ventralmente (Fig. 4), já a EfrinaB1 está presente na parte posterior do somito, ao migrar, a célula que expressa EphB3 interage com a EfrinaB1 expresso nos somitos e causa uma resposta repulsiva, que mantém as células migrando isoladamente para a parte ventral do embrião (WANG; ANDERSON, 1997). Santiago e Erickson (2002) demonstraram que há Efrinas na rota lateral no momento em que as células da CNT estão migrando exclusivamente pela rota ventral. E caso haja diminuição na expressão dos receptores Eph neste local, as células que antes migrariam ventralmente, migrarão para a rota lateral, demonstrando que as Efrinas podem atuar de forma diferencial na migração das células da CNT. Elas observaram também, que há Efrinas presentes na rota lateral no momento de migração dos progenitores de melanócitos, que expressam receptores EphB 1-3, caso estes receptores sejam inativados no

momento de sua migração, as células falharão em migrar pela rota dorso lateral. Resultados *in vitro* mostraram que as Efrinas promoveriam a migração de melanoblastos aumentando a adesão na matriz extracelular, portanto, a interação Efrinas-receptor EphB seria um dos responsáveis pela migração das células da CNT pela rota lateral.

Contudo, os diferentes tipos de proteínas e interações apresentados nesse trabalho são uma pequena porção de um vasto campo que é a migração e diferenciação de melanócitos. Apesar de inúmeros dados sobre as proteínas, pouco se sabe como elas interagem e afetam as células. Entender os mecanismos envolvidos na mudança de rota de migração das células da CNT é o passo inicial para entender os mecanismos moleculares presentes para ativação do programa de diferenciação de melanócitos. O melanoma é um dos cânceres com maior taxa de metástase e um dos mais frequentes nos brasileiros segundo o INCA (INCA, 2020). Entender a biologia dos melanócitos e como se dá a relação entre proteínas envolvidas desde o começo da sua diferenciação pode auxiliar na compreensão dos fenômenos metastáticos das células cancerígenas e criação de novos fármacos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

- Identificar, *in silico*, possíveis vias de sinalização que controlam a migração das células da crista neural pela rota lateral.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Criar um banco de dados de proteínas relacionadas ao início da migração das células da crista neural pela rota lateral;
- Identificar em bancos de dados de hibridização *in situ*, genes que aumentem sua expressão em regiões anatomicamente relacionadas ao início da migração das células da CN pela rota lateral;
- Estabelecer correlações moleculares entre as proteínas identificadas no tópico anterior, com proteínas que conhecidamente sejam expressas pelas células da CN que migrarão pela rota lateral;
- Propor hipóteses teóricas que contribuam para a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a migração das células da CNT pela rota lateral;
- Utilizar ferramenta *in silico* para testar a coerência das hipóteses elaboradas.

2 METODOLOGIA

2.1 CRIAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Para criar o banco de dados descrito neste trabalho, foi escolhido o portal PubMed[®] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Dentre os vários bancos de dados biológicos abrigados no PubMed[®], destaca-se a plataforma gratuita de armazenamento de artigos, contando com mais de 30 milhões de artigos e resumos das diversas áreas biomédicas. Para apresentar dados com maior acuracidade no presente trabalho, foi criado um padrão de busca Booleana, já que o banco de dados também trabalha com o padrão Booleano. Os termos AND e OR foram utilizados na pesquisa para tentar correlacionar as diferentes proteínas. Com o intuito de limitar e refinar os possíveis resultados, foi determinado que apenas artigos que citassem as proteínas em seus respectivos títulos ou resumos [TIAB] deveriam aparecer nos resultados da pesquisa. Logo, o seguinte padrão de busca no PubMed[®] foi criado “Proteína1[TIAB] AND Proteína2[TIAB]” ou ainda “Proteína1 [TIAB] AND (Proteína 2 [TIAB] OR Proteína3 [TIAB])”. Esses padrões foram determinados após extensas análises da relevância para nossos objetivos. Essa relevância foi estabelecida analisando dados obtidos sem nenhum filtro × com os filtros citados acima. As informações retiradas deste portal foram armazenadas em documentos para uso posterior.

2.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES DURANTE A MIGRAÇÃO LATERAL

Parte do levantamento das proteínas presentes durante o começo da migração das células da CNT foi realizada pelo banco de dados Geisha[®] (BELL; YATSKIEVYCHM; ANTIN, 2004; <http://geisha.arizona.edu>), site que armazena imagens de hibridizações *in situ*, presentes em artigos ou armazenadas diretamente pelos cientistas. Para procurar possíveis proteínas presentes no mesmo local em que as células da CNT começaram a migrar pela rota dorsal, foi estabelecido utilizar a busca pela região anatômica da ectoderme, que engloba a crista neural e na região dos somitos, no qual engloba, dermatômo, dermomiótomo, miótomo, derme e esclerótomo no estágio de desenvolvimento de 14-15HH. Onde foram encontrados 1287 resultados. Dentre essas proteínas foram selecionadas apenas 10 proteínas solúveis

presentes nas proximidades da rota lateral de migração das células da CNT (região dos somitos, CNT e dorso do TN).

2.3 PESQUISA DE GENES

As possíveis proteínas responsáveis pela migração das células da CNT pela rota lateral obtidas através do levantamento de dados através do PubMed[®] foram posteriormente analisadas no portal GeneCards[®] (STELTZER et al., 2006; <https://www.genecards.org/>), local onde há informações como proteômica, transcriptômica, genômica e a função sobre diferentes proteínas, obtidos em mais cerca de 150 fontes diferentes. Este portal foi utilizado para entender a genômica das proteínas e quais os sítios de ligação de fatores de transcrição os genes pesquisados possuem, para analisar as vias de sinalização, via PathCards[®] (BELINKY et al., 2015; pathcards.genecards.org) e para analisar as doenças associadas com tais proteínas, via MalaCards[®] (RAPPAPORT et al., 2016; www.malacards.org).

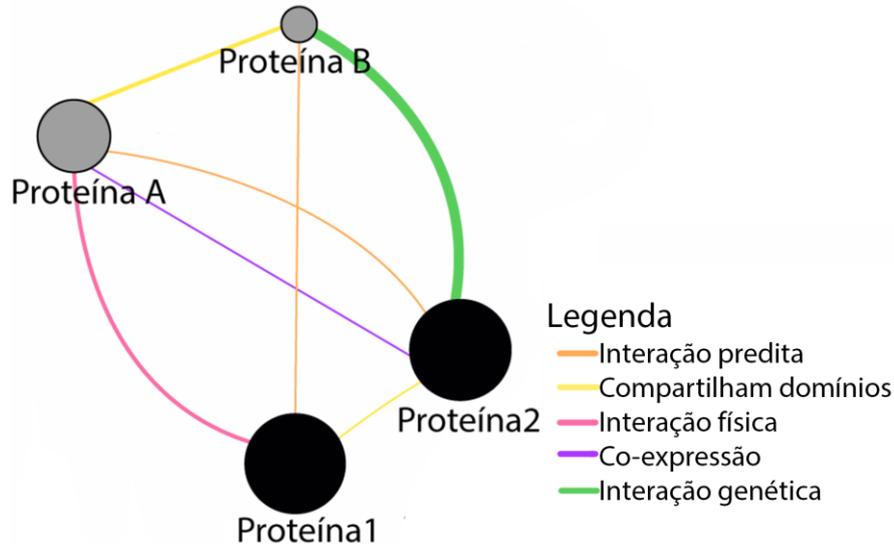
2.4 ANÁLISE DE INTERAÇÕES PROTEICAS

As análises de possíveis interações entre proteínas, sejam elas fatores solúveis ou de transcrição, foram realizadas na plataforma GeneMania[®] (WARDE-FARLEY, 2010; <https://genemania.org/>) e plataformas como String[®] (SZKLARCZYK et al., 2019; <https://string-db.org/>) ou Kegg[®] (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA; SATO, 2000; KANEHISA 2009; <https://www.genome.jp/kegg/>) foram utilizadas para verificar os dados obtidos. O GeneMania[®] busca interações entre genes utilizando um banco de dados públicos, onde a partir da disponibilização dos dados a plataforma calcula *scores*, que são intensificados através da espessura das linhas (Fig.14). O tamanho dos círculos presente nos resultados são referentes à quantidade de interações que os mesmos possuem (MONTJOJO et al., 2014) (Fig. 14). A plataforma não apresenta dados de proteínas para *Gallus Gallus*, então foi determinado o uso do filtro *Mus musculus*, pois para essa espécie o volume de dados é maior e os mecanismos associados à migração da CN são praticamente idênticos entre essas duas espécies.

Ao realizar a análise das interações proteicas, é gerado uma imagem com linhas de diferentes cores representando as interações entre as proteínas alvo (Fig. 15). A linha roxa representa co-expressão de proteínas (entre a Proteína2 e Proteína A, Fig. 15), ou seja, são

dados coletados de publicações do Gene Expression Omnibus (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002), no qual dois genes compartilham nível de expressão similar sob as mesmas condições de estudo. A interação física é representada pela cor rosa na Fig. 15, entre as Proteína1 e ProteínaA. Essa interação é representada através de estudos laboratoriais sobre a interação proteína-proteína e são armazenados em bancos de dados como BioGrid (OUGHTRED et al., 2019). A cor verde representa a interação genética (ProteínaB e Proteína2, Fig. 14), onde dois genes são associados se há evidências de um gene modificar a transcrição de um segundo gene. Os dados apresentados são retirados do banco de dados BioGrid (OUGHTRED et al., 2019). A cor amarela representa o compartilhamento de domínios (ProteínaB e ProteínaA, Fig. 15), no qual dois produtos gênicos são interligados caso compartilhem o mesmo domínio proteico. Os dados são coletados do Pfam (EL-GEBALI et al., 2019) e InterPro (MITCHEL et al., 2019). E por último, a interação predita, em laranja, ente a ProteínaA e Proteína2, onde a maior fonte dessas interações são via estudos de outros organismos e assim, é traçado um paralelo, via ortologia.

Figura 15 – Exemplo de interações proteicas



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Um exemplo de análise proteica, a fim de entender as interações e os *scores* das mesmas.

2.5 REFINAMENTO DAS ANÁLISE DAS INTERAÇÕES PROTEICAS

A fim de plotar imagens mais compreensíveis, foi utilizado o software Cytoscape® (SHANNON et al., 2003) com *plugin* do GeneMania®, onde é possível excluir os nós de que

que não tinham correlação entre as proteínas foco ou que não apresentavam função no desenvolvimento das células da crista neural. Para melhor observação parte dos nós foram ocultados. A visualização das interações originais poderão ser acessadas através dos *links* disponíveis nas notas das respectivas figuras.

2.6 CONFECÇÃO DAS IMAGENS

As imagens produzidas pela autora nesse trabalho foram criadas a partir dos *software* Illustrator[®] e Photoshop[®] e desenvolvidas com o auxílio de uma mesa digitalizadora Wacom Intuos Pen Draw Fun[®].

3 RESULTADOS

Os resultados presentes neste trabalho são produtos de uma extensa revisão bibliográfica e uma série de análises *in silico*. Inicialmente serão apresentadas informações conhecidas sobre a migração das células da CNT pela rota lateral e, conseqüentemente, sobre a diferenciação dessas células para melanócitos. Em seguida, serão apresentadas novas proteínas que poderiam participar desse processo. Por último, serão elaboradas hipóteses que integram essas novas proteínas aos mecanismos já conhecidos. A coerência molecular dessas hipóteses será testada utilizando ferramentas *in silico* de associação de genes e associação entre vias de sinalização.

3.1 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL PELA ROTA LATERAL

O início da migração das células da CNT é marcado por alguns eventos moleculares que ocorrem concomitante. Após o fechamento do TN, na sua região dorsal, ocorre um aumento gradativo da expressão de Bmp4 e 7 em direção a região anterior do embrião (Fig. 1). Ao atingir determinado limiar de expressão de Bmp4 e 7, as células da CNT começam a migrar. Ao mesmo tempo, na região dorsal do TN, onde se iniciará a migração das células da CNT, ocorrerá redução na expressão de Noggin (SELA-DONENFELD; KALCHEIM, 1999, 2000, 2002). Além disso, em aves, o início da migração das células da CNT coincide, anatomicamente com a região onde se inicia a formação do somito. É importante ressaltar que em embriões de aves são formados 42 a 44 pares de somitos, um de cada vez em intervalos de aproximadamente 1,5h (GILBERT; BARRESI, 2017). Ou seja, ao formar o primeiro par de somitos, entre eles, no dorso do TN, as células da CNT iniciarão sua migração. Esse processo se repetirá sucessivamente até a formação do último par de somitos. Uma vez iniciada a migração, as células da CNT continuarão a migrar por um longo período de tempo, dessa forma, durante todo o processo de migração das células da CNT, o somito continuará seu desenvolvimento, sendo que as moléculas sinalizadoras produzidas pelos somitos, TN e CNT influenciarão uma no desenvolvimento da outra. Durante o desenvolvimento dos somitos, a porção mais lateral deles começará a expressar Noggin. Essa expressão, gradativamente se torna mais medial, até ficar restrita ao lábio dorsomedial do dermomiótomo, muito próxima do dorso do TN. Nesse momento, as células da CNT que vinham migrando por uma rota

ventral, passam a migrar pela rota lateral, reduzindo a expressão de FoxD3 e começando a expressar *Ednr2*, *EphB2*, *Mitf*, *Robo1* e *2* e *Lef1*.

Não há consenso entre os pesquisadores de quais proteínas, ou falta delas, são responsáveis pela mudança de rota dos precursores de melanócitos, deixando várias questões em aberto: Por que apenas os progenitores de melanócitos migram por essa região? O que mudou na expressão das células e/ou no microambiente para que migrem pela rota lateral? Para tentar responder tais perguntas, foram realizadas análises baseadas em três tipos de buscas:

- Extensa revisão bibliográfica em busca de proteínas já descritas como prováveis controladoras do início da migração das células da CNT para a rota lateral;
- Identificação de proteínas que tenham sua expressão alterada na região anatômica e temporal exata onde as células da CNT iniciam sua migração pela rota lateral;
- Busca de possíveis interações e/ou relações entre proteínas que, conhecidamente, possam participar da ativação da migração das células da CNT pela rota lateral, com as novas proteínas identificadas.

Foram identificadas, inicialmente, 1289 proteínas presentes nos estágios de desenvolvimento 14 e 15HH. Esses estágios foram selecionados pois é possível facilmente identificar a região de migração das células da CNT para a rota lateral. Dentre essas proteínas, foram selecionadas apenas proteínas solúveis presentes nas proximidades da rota dorsal de migração das células da CNT (região dos somitos, CNT e dorso do TN), chegando a um total de 10 proteínas solúveis (Tabela 1). Para determinar as mais promissoras, foram escolhidas proteínas que apresentaram maior relação com a melanogênese no banco de dados PubMed®. As proteínas solúveis mais promissoras foram:

- *Noggin*: um dos responsáveis pelo bloqueio de *Bmp*, Sela Donenfeld e Kalcheim (2002) mostraram que sua diminuição na sua expressão no dorso do TN (Fig.16B), a medialização da sua expressão no lábio dorsomedial do dermomiótomo poderia ser um dos responsáveis pelo começo da migração lateral, além de restringir a expressão de *Bmp4* e *7* no dorso do TN. Osório e colaboradores (2009) mostraram que, na região sacral, o ganho de expressão

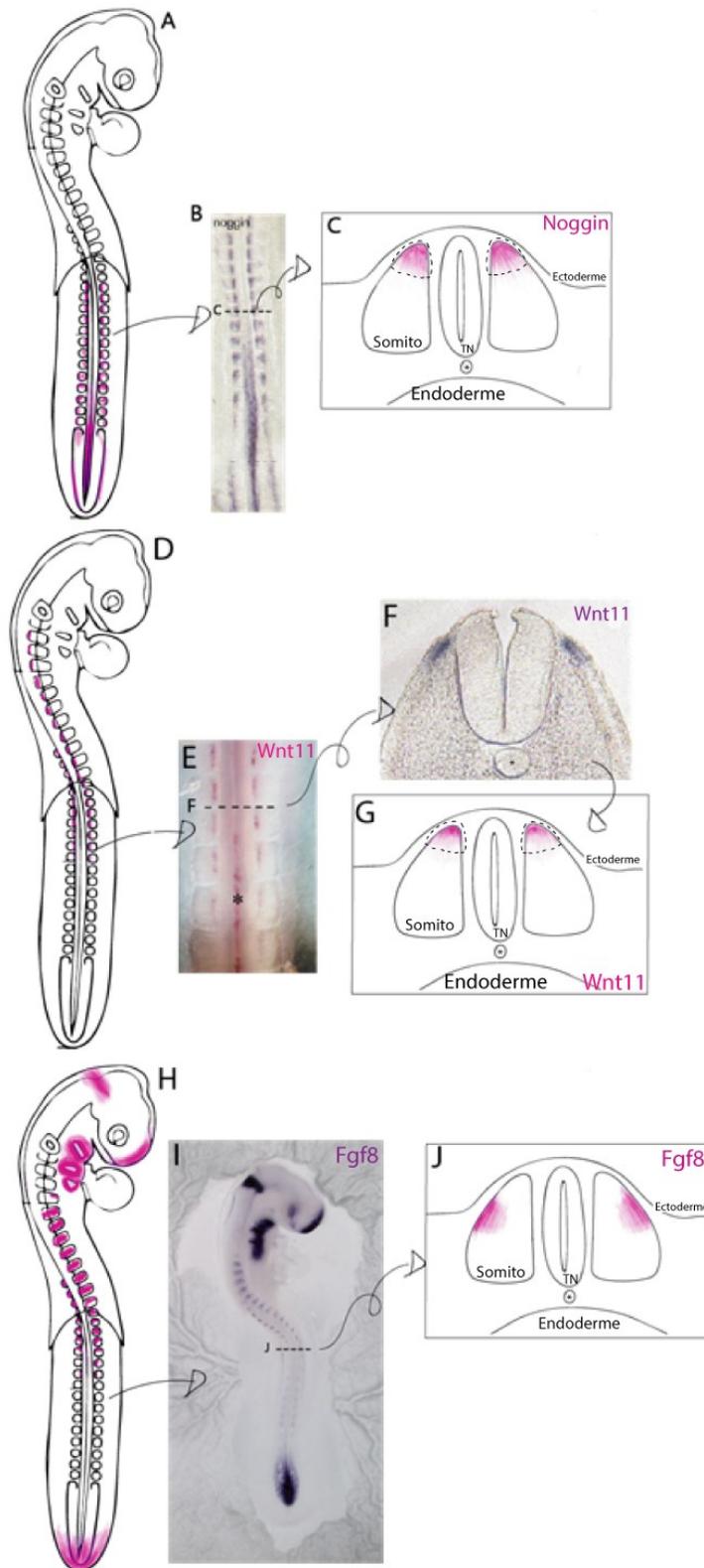
de Noggin na CNT é capaz de bloquear a expressão de FoxD3. No entanto, o trabalho de Osório de colaboradoras (2009) além de se restringir à CN sacral, eles ainda não descrevem o mecanismo associado ao bloqueio de FoxD3 pelo Noggin.

- Wnt11: é expresso no lábio dorsomedial do dermomiótomo, onde sua expressão coincide com o começo da migração lateral das células da CNT, sua expressão poderia estar correlacionada com o início da migração das células progenitoras de melanócitos (Fig.16D).
- Fgf8: começa a ser expresso na parte central do dermomiótomo, entretanto, sua expressão se torna medial com desenvolvimento do embrião, ficando localizada no lábio dorsomedial do dermomiótomo no momento da migração lateral (Fig. 16J).

Tabela 1 – Análise das proteínas expressas durante o início da migração dos progenitores de melanócitos

Dkk1
Noggin
Wnt11
Wnt1
Wnt4
Wnt5b
Fgf8
TgfB2
Cxcl12
EphrinB2
Lef1

Figura 16 – Proteínas promissoras como candidatas a participar do controle da migração das células CNT pela rota lateral

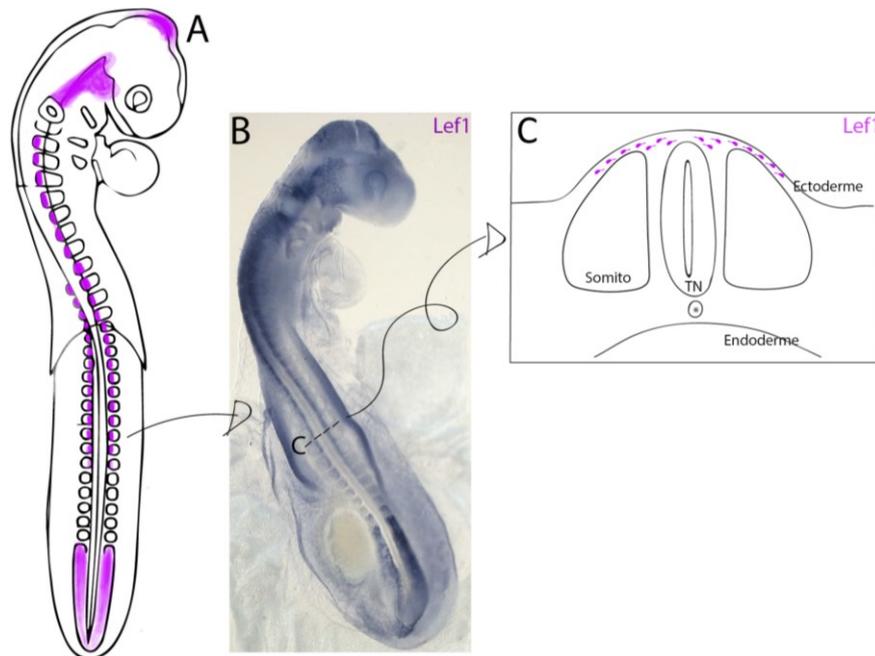


Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Representação das expressões de Noggin, Wnt11 e Fgf8 *in vivo* onde (A) mostra o desenho de um embrião de galinha de 20s, onde em roxo é a marcação de Noggin. Em (B) imagem de uma hibridização *in situ* para Noggin. (C) Representação de um corte transversal com marcação de Noggin nos somitos. (D) Representação da expressão de Wnt11. (E) e (F) Imagens de hibridização *in situ* para Wnt11. (F) e (G) hibridização *in situ* para Wnt11 em corte transversal e sua representação. (H) Hibridização *in situ* para Fgf8, (I) sua representação no embrião e (J) em corte transversal. Disponíveis em: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=461905, http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=449534, http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=459378. Acesso em: 24/01/2020. (TN) Tubo neural, (*) notocorda.

A sinalização Wnt tem forte influência sobre as células da CNT que migram pela rota lateral, sendo Lef1 um dos intermediários utilizados. Sua expressão as células da CNT e têm início no momento da migração lateral (Fig. 16). Apesar de não haver dados que liguem Lef1 diretamente na migração das células da CNT, há trabalhos que mostram que Lef1 é um dos fatores de transcrição que controlam a expressão de E-Caderina e Fibronectina, proteínas envolvidas na adesão e migração celular (GRADL; KÜHL; WEDLICH, 1999; HUBER; BIERKAMP; KEMLER, 1996). A ação de Lef1 é mais evidente na diferenciação dos melanócitos, onde o fator de transcrição master de melanócitos, Mitf, possui um sítio de ligação para Lef1 em um de seus sítios promotores (SHIBAHARA et al., 2001). Yasumoto e colaboradores (2002), mostram também que Lef1 é um dos transativadores do promotor de *Mift* e sinergicamente, ativaria a expressão de Dct. Já Wang e colaboradores (2015) mostraram que Lef1 se liga ao promotor de *Tyr*, ativando a expressão desse gene. Foi observado que também há transativação de *Tyr* por Lef1 e Mitf de forma sinérgica. Xu e colaboradores (2019) através de estudos de bioinformática sugerem que *EdnrB*, *Mitf* e *Lef1* são importantes para a via da melanogênese em melanomas, implicando que estes genes são alvos importantes para o desenvolvimento de terapias. Após extensa busca de artigos na tentativa de correlacionar o aumento da expressão de Lef1 com as proteínas Noggin, Wnt11 e Fgf8, concluímos que a correlação mais promissora foi com a sinalização Bmp/Noggin.

Figura 17 – Representação da expressão de Lef1 durante o desenvolvimento de um embrião de galinha



Fonte: Produzido pela autora (2020) e GEISHA.

Nota: Esquema representativo da expressão de Lef1. (A) Ilustração de um embrião de galinha com as áreas em roxo representando a expressão de Lef1. (B) Imagem da hibridização in situ para Lef1 de embrião de galinha de 16s. Disponível em: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=450784. Acesso em: 24/01/2020. (C) Representação de um corte transversal de um embrião, onde em roxo representa a expressão de Lef1 no lábio dorsal do dermomiótomo. (TN) tubo neural e (*) notocorda.

3.2 HIPÓTESE1: O AUMENTO NA EXPRESSÃO DE LEF1 É CAUSADO PELO BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO BMP4 E 7

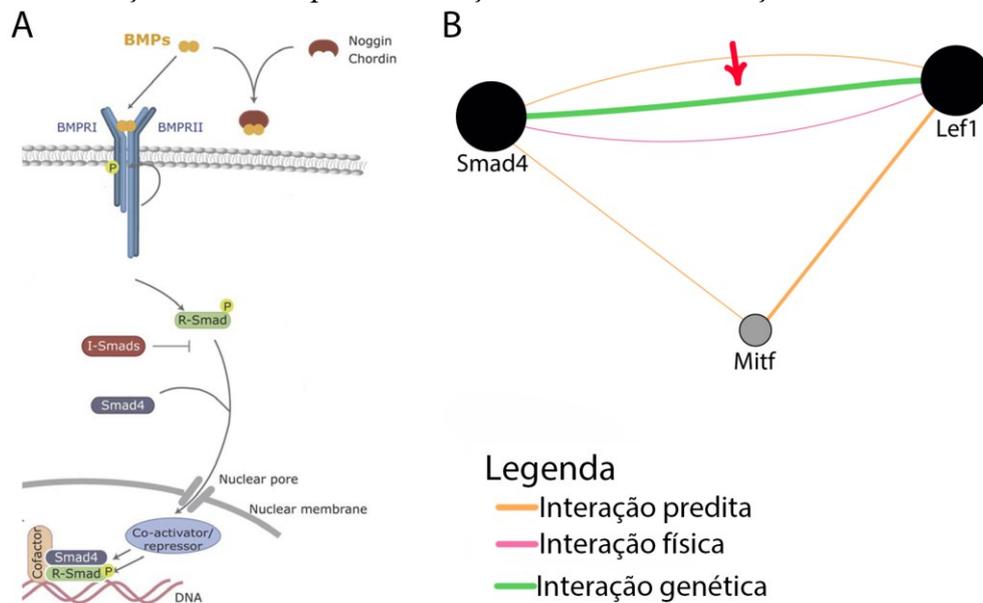
Para testar essa hipótese, foi realizado um levantamento bibliográfico através do PubMed® com as 3 proteínas selecionadas anteriormente Noggin, Wnt11 e Fgf8, como citadas anteriormente, porém, a de maior correlação com a migração lateral e melanogênese foi Lef1 e Bmp4 e 7/Noggin, então foram utilizados os termos de busca “Lef1[TIAB] AND Noggin[TIAB] foram encontrados somente resultados não relacionados às células da CNT, porém Botchkarev e colaboradores (2002) mostraram que camundongos que possuem *Noggin* inativado não produzem Lef1 em folículo piloso, já Cho colaboradores (2006) mostram que durante o desenvolvimento de glândulas mamárias a expressão de Noggin diminui a expressão de Lef1, já que Noggin é responsável pelo bloqueio de Bmp e esse seria um de seus ativadores. Mostrando que a ação de Noggin é indireta sobre Lef1, atuando através do

bloqueio de Bmp4 e 7. Ao pesquisar o termo “Lef1[TIAB] AND (Bmp4 [TIAB] OR Bmp7[TIAB])”, foram encontrados 44 resultados dos quais nenhum deles abordava as células da CNT. Entretanto, em outros sistemas foi observada a seguinte dicotomia: I. Segundo autores como Kratochwil e colaboradores 1996 e Armenteros et al., (2018), a expressão de Lef1 poderia ser induzida por Bmp4 no desenvolvimento de dentes ou em células hipocâmpais, respectivamente; II. Jamora e colaboradores (2018) mostraram que no desenvolvimento do epitélio no broto dos membros, o ganho na expressão de Noggin é seguida pelo aumento na expressão de Lef1. Na tentativa de fazer uma extrapolação desses dados para a migração das células da CNT, facilmente excluimos o primeiro mecanismo relatado. A presença de Bmp4 e 7 é constante durante toda a migração das células da CNT, no entanto observamos ganho de Lef1 apenas nas fases finais de migração. Ainda, se, na CNT, Lef1 fosse induzida por Bmps, como relatado em células hipocâmpais, quando a expressão de Noggin no somito atingisse o lábio dorsomedial do dermomiótomo, as células da CNT deveriam diminuir a expressão de Lef1, já que Noggin é antagonista de Bmp4 e 7, mas o que ocorre é justamente o contrário. Portanto, a partir dos dados encontrados, podemos inferir que apesar de haver dados mostrando que Bmp4 e 7 causam aumento de Lef1, não descartamos a hipótese que o bloqueio da sinalização Bmp causaria o aumento de Lef1, já que há dados ao bloquear Bmp com Noggin, há aumento na expressão de Lef1.

A fim de buscar mais informações sobre a interação entre Lef1 e Bmp4 e 7, foi observado que a proteína Smad4, responsável pela transdução de sinal da sinalização Bmp (Fig. 18A), é uma das proteínas responsáveis pela ativação de Lef1. No desenvolvimento do palato de camundongos, a ligação de Smad4 em Lef1 causa a TEM (NAWSHAD; HAY, 2003). De forma ambígua, Smad4 também atua na repressão de Lef1 em neuroblastomas (QU et al., 2016). Labbé e colaboradores (2000) mostram que a sinalização Bmp é capaz de atuar concomitante com Lef1, acoplando-o no complexo Smad, para a transcrição de *Twin* ou ainda atuar em conjunto com moléculas da sinalização Wnt. Considerando esse dados, poderíamos hipotetizar que o mesmo ocorre durante a migração dos progenitores de melanócitos: No início da migração das células da CNT, Bmp4 e 7 estariam ativos. Com desenvolvimento e a medialização do Noggin no lábio dorsomedial do dermomiótomo, os Bmp4 e 7 são bloqueados, permanecendo apenas a sinalização Wnt, via Lef1. O aumento de Lef1 que foi observado nas hibridizações *in situ* (Fig. 17) poderia ainda ser explicado pela inibição de Bmp4 e 7 via Noggin, pois segundo Qu e colaboradores (2016) Smad4, ativada por Bmp, é capaz de reprimir Lef1. Ou seja, o bloqueio de Bmp4 e 7 por Noggin reduziria a fosforilação

de Smad4 e conseqüentemente aumentaria Lef1. É importante ressaltar que essa informação não é unânime, como citado acima, alguns trabalhos mostram que dependendo tipo de célula Smad4 e Lef1 podem ser co-expressas e atuarem conjuntamente (LABBÉ; LETAMENDIA; ATTISANO, 2000).

Figura 18 – Ilustração da via Bmp de sinalização e análise da interação entre Smad4 e Lef1



Fonte: GÁMEZ; RODRIGUEZ-CARBALLO; VENTURA, 2013 e produzida pela autora (2020).

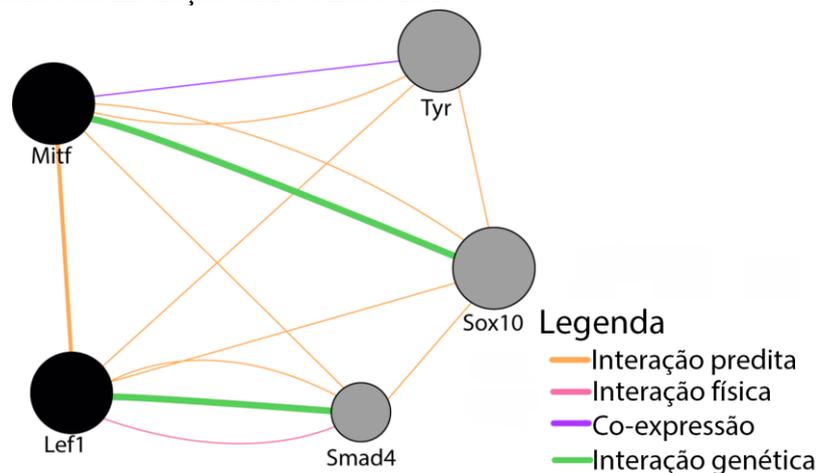
Nota: (A) Via de sinalização Bmp, onde em laranja mostra a proteína Bmp e em magenta seus antagonistas Noggin e Chordin, que bloqueiam fisicamente a ligação de Bmp com seus receptores e assim, não conseguindo ativar a via Smad de transdução de sinal. (B) Análise da interação das proteínas Smad4 e Lef1 (em preto) onde é possível observar a linha em verde mostrando uma alta interação genética entre essas proteínas (seta em vermelho). Outras proteínas que também atuam na melanogênese ou na via Smad estão representadas em cinza. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/sm4/lef1/>. Acesso em: 24/01/2020.

A partir desses dados, foi considerado que o aumento na expressão de Lef1, induzido pelo bloqueio de Bmp, seria importante para o início da migração das células da CNT pela rota lateral. Para testar a força dessa hipótese, foi realizada uma busca por proteínas que, como Lef1, tinham sua expressão alterada nas células da CNT que migram pela rota lateral, a fim de correlacionar com o mecanismo acima proposto. O FoxD3 é um fator de transcrição que reprime *Mitf* nas células da CNT, logo no começo da migração lateral a expressão de FoxD3 é reduzida, permitindo a expressão de *Mitf* e *EdnrB2* (CURRAN; RAIBLE; LISTER, 2009; IGNATIUS et al., 2008). O banco de dados GeneCards® mostra que *FoxD3* possui um sítio de ligação de Lef1, podendo este último atuar como seu repressor. Logo, foi realizada busca no site PubMed® por termos como “FoxD3[TIAB] AND Lef1[TIAB]” que gerou

apenas 3 resultados, dos quais apenas um mostrou-se promissor. Janssens e colaboradores (2013) mostram que *Tcf1* é uma proteína essencial para a ativação da expressão de *FoxD3* na organogênese de *Xenopus l.*. O *Tcf1* e *Lef1* são fatores de transcrição que podem atuar de forma competitiva pelo sítio de ligação de um gene ou de forma conjunta (YU et al., 2012). Logo, inferimos que apesar de *Tcf1* induzir a expressão de *FoxD3* durante parte da migração da CNT, o aumento de *Lef1* seria responsável pela inibição de *FoxD3*, já que este aumento causaria uma maior probabilidade de ligação de *Lef1* em *FoxD3*, bloqueando a ação de *Tcf1*. No entanto, realizando uma análise de relação biológica entre *Lef1* e *FoxD3*, essa hipótese se mostrou pouco consistente, pois nos bancos de dados analisados não foi relatado nenhuma interação entre esses dois fatores de transcrição.

Ao testarmos as possíveis ligações entre *Mitf* e *Lef1*, foi observado uma alta relação predita entre esses dois fatores de transcrição (Fig. 19). Curiosamente, o fator de transcrição *Smad4* também aparece, porém com grau menor de relação. Sua atuação com *Mitf*, poderia ser como já supracitado, em que *Smad4* e *Lef1* atuam de forma conjunta. Porém, com o bloqueio de *Bmp* por *Noggin*, *Smad4* não é mais fosforilada, deixando *Lef1* ativar outros genes, como o *Mitf*. Portanto inferimos que quando *Smad4* está fosforilada e atuando com *Lef1*, não há ativação de *Mitf*, já ao bloquear a fosforilação de *Smad4*, *Lef1* fica livre e é capaz de ativar *Mitf*.

Figura 19 – Análise da interação entre *Mitf* e *Lef1*

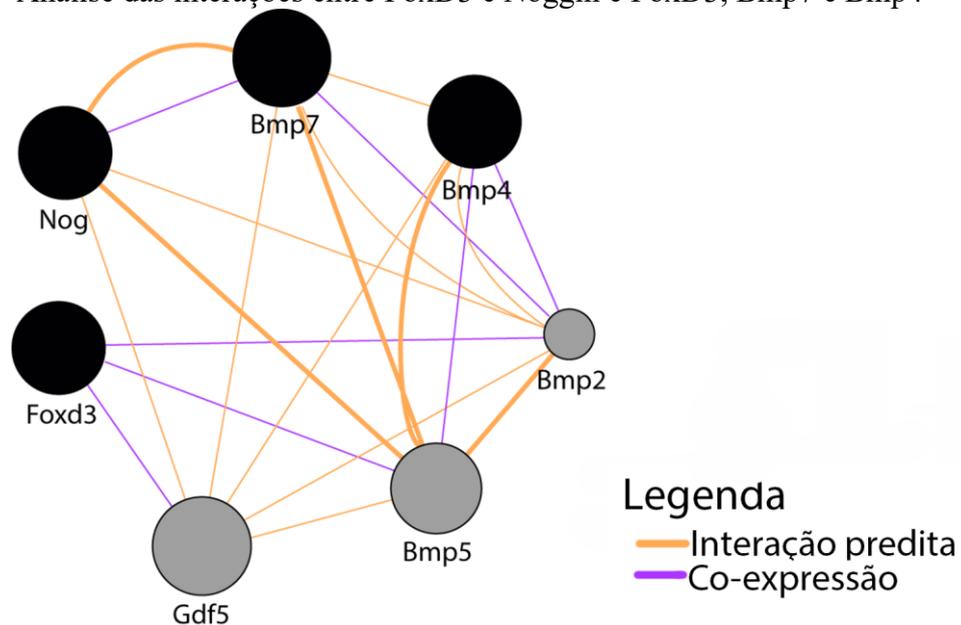


Fonte: Produzida pela autora (2020).

Nota: Análise da interação das proteínas *Mitf* e *Lef1* (em preto), onde podemos observar uma forte interação genética entre *Lef1* e *Sma4*. As demais proteínas em cinza são proteínas referentes à melanogênese. Cada cor de linha descreve uma relação, conforme apresentado à direita. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/mitf/lef1/>. Acesso em: 24/01/2020.

Além disso, ainda é possível que a repressão de FoxD3 esteja associada à redução na sinalização Bmp que ocorre com a expressão de Noggin no lábio dorsomedial do dermomiótomo, conforme mostrado na Fig. 3D. Analisando uma busca de possíveis relações entre a sinalização Bmp/Noggin com FoxD3 no site GeneMania® observamos que não há relação direta entre Noggin/Bmp4 e 7 e FoxD3, porém, indiretamente Gdf5 parece ser um bom candidato para atuar mediando a interação de Noggin/Bmp e FoxD3 (Fig. 20). Gdf5 é da família do Tgf- β , também conhecido como Bmp14. Noggin, por sua vez, é seu antagonista. A chegada de Noggin na região medial do embrião poderia bloquear fisicamente Gdf5, e isso faria com que inativasse FoxD3, entretanto, os dados disponíveis não nos permitem avançar nessa hipótese.

Figura 20 – Análise das interações entre FoxD3 e Noggin e FoxD3, Bmp7 e Bmp4



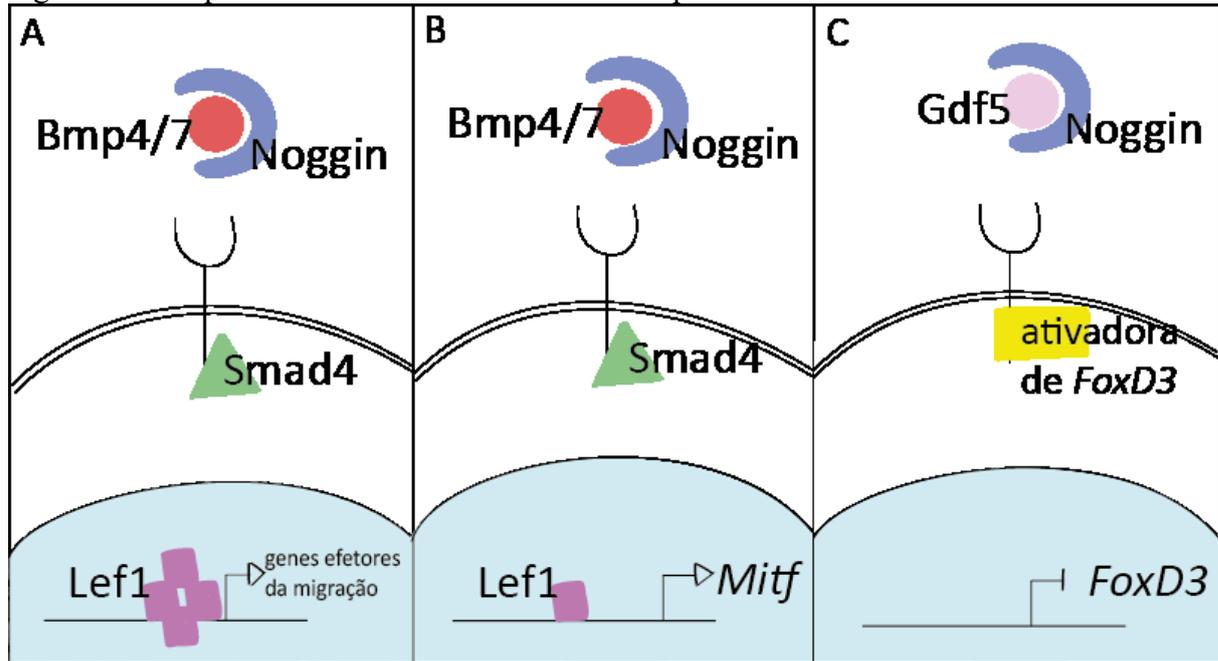
Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Análise da interação entre Noggin e FoxD3 (A) onde é possível observar que não há nenhuma interação entre eles, porém, há uma forte interação entre Noggin, Bmp7 e 4 e Gdf5. Cada cor de linha descreve uma relação, conforme apresentado à direita. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/foxd3/nog/> e <https://genemania.org/search/mus-musculus/foxd3/bmp7/bmp4/>. Acesso em: 24/01/2020.

Em conjunto com as informações supracitadas, podemos inferir que a medialização de Noggin é responsável por bloquear Bmps do dorso do TN e, por consequência, poderia influenciar na migração das células da CNT. Esta influência pode ser dada através da não fosforilação de Smad4, acarretando num aumento de Lef1 no sistema, que culminaria na migração das células progenitoras de melanócitos (Fig. 21A). Hipóteses como a Lef1

bloqueando FoxD3 mostrou-se frágil por não apresentar dados biológicos, ou ainda a hipótese em que Lef1 poderia ativar *Mitf*, que apesar de haver relação direta entre eles, apresenta uma forte interação com Smad4, implicando talvez, que a ação Lef1 seja através da não fosforilação de Smad4 (Fig. 21B). A repressão de FoxD3 pode ser através da chegada de Noggin na parte medial, que bloquearia Gdf5, e com isso, não ativaria FoxD3 (Fig. 21C).

Figura 21 – Esquema ilustrado das conclusões da hipótese 1



Fonte: Produzido pela autora (2020)

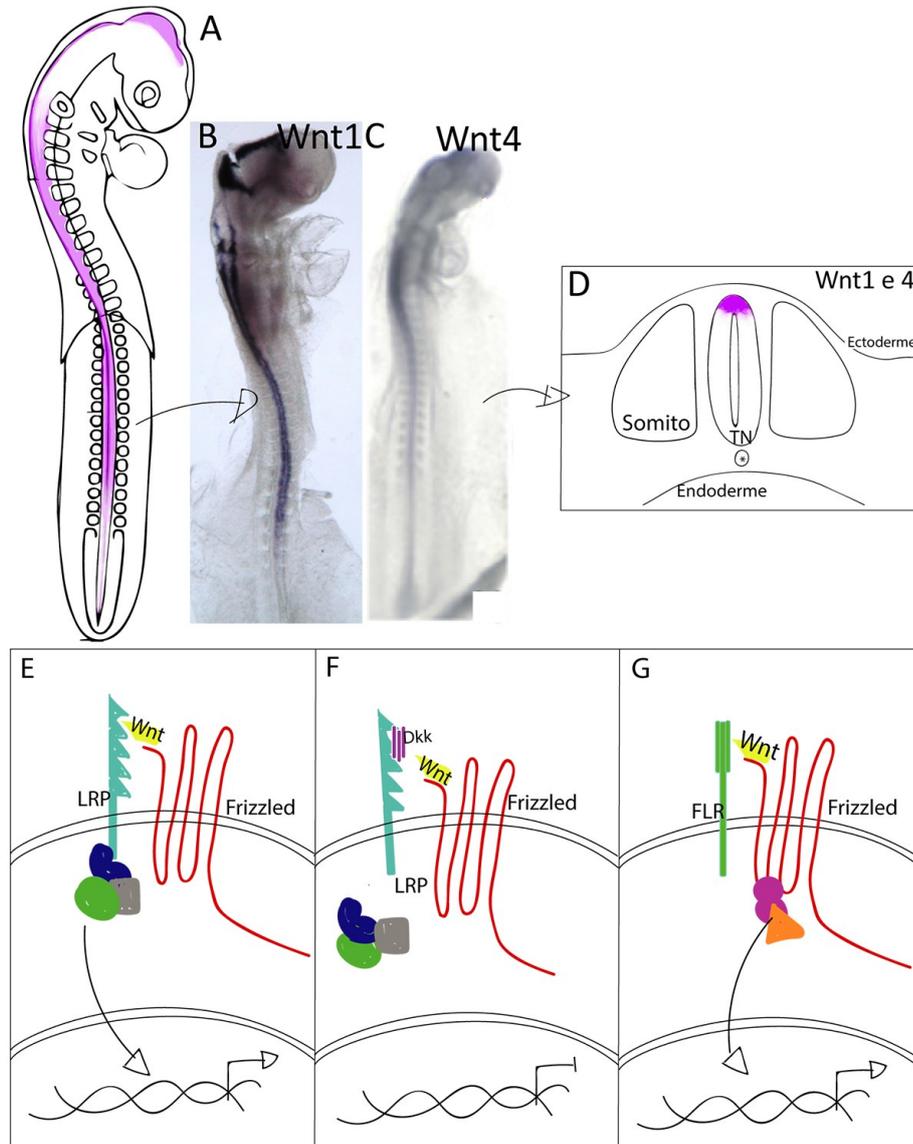
Nota: Esquema mostrando as principais conclusões da hipótese 1. Em A e B temos Noggin (azul) bloqueando Bmp4 e 7 (vermelho) consequentemente, Smad4 (verde) não é fosforilada e o aumento de Lef1 pode causar a migração das células progenitoras de melanócitos (A), ou a expressão de *Mitf* (B). (C) Noggin bloqueia Gdnf5 (roxo) e com isso a proteína ativadora de FoxD3 (amarelo) não consegue ativá-lo.

3.3 HIPÓTESE 2: SINALIZAÇÃO MEDIADA POR WNT11 PARTICIPARIA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT PELA ROTA LATERAL

Durante todo o período de migração das células da CNT observamos alta expressão de Wnt 1 e 4 no dorso do TN (Fig. 22B-C). Apesar de já descrita a importância da sinalização Wnt para o desenvolvimento dos progenitores de melanócitos (EBLAGHIE et al., 2004), no dorso do TN, não observamos alterações na expressão de Wnts que possam explicar a mudança de rota de migração das células da CNT (de ventral para lateral). A sinalização Wnt envolve a interação entre Wnt e seus receptores Frizzled e Lrp (Fig. 22E) ou Frizzled e Frl (Fig. 22G), formando um complexo ativo, responsável por iniciar a transdução de sinal

(MIKELS; NUSSE, 2006). O complexo entre Wnt e seus receptores pode ser inibido pelo seu antagonista natural, Dickkopf (Dkk) através da ligação com Lrp, não deixando criar um complexo com Frizzled e então bloqueando a transdução de sinal da via Wnt (Fig. 22F).

Figura 22 – Representação das hibridizações *in situ* para Wnt1 e Wnt4 e diferentes receptores de Wnt



Fonte: Produzido pela autora (2020) e banco de dados Geisha.

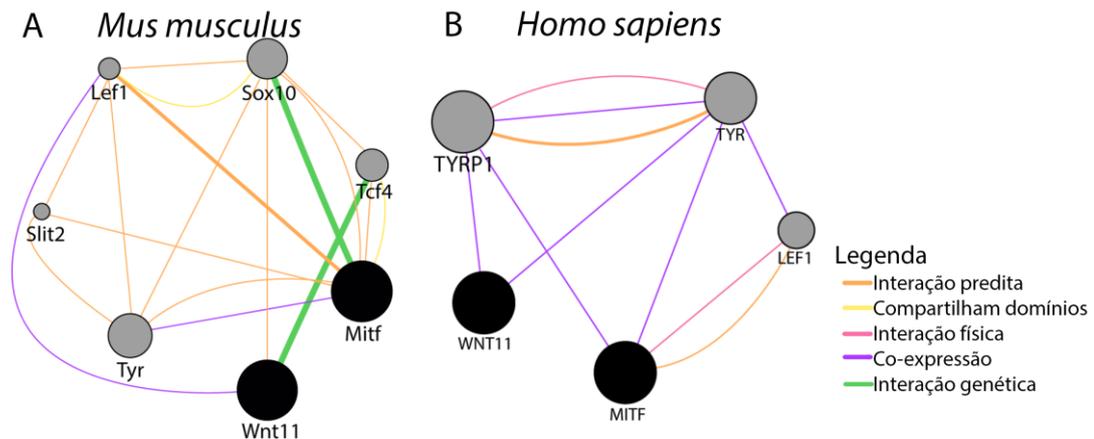
Nota: Representação das expressões de Wnt1 e Wnt4, ambas na parte dorsal do tubo neural (A). (B) e (C) Hibridizações *in situ* para Wnt1 e Wnt4, respectivamente, onde as linhas tracejadas representam a altura do corte mostrado em (D). Disponível em: http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=459062 e http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=449535. Acesso em 24/01/2020. (D) Representação de um corte transversal com marcações para Wnt1 e 4. Diferentes formas de entrada de Wnt em uma célula. (E) Via Lrp e Fzd, onde a formação deste complexo faz com que ative proteínas intracelulares. (F) O antagonista de Wnt, Dkk se liga a Lrp, não deixando formar o complexo ativo, impedindo a sinalização intracelular. (G) Complexo Flr e Fzd, onde independente de Lrp, Wnt se liga a eles, formando um complexo proteico. (TN) Tubo neural, (*) notocorda

Ao realizar uma extensiva análise da expressão de diferentes Wnts durante a migração das células da CNT, além da expressão de Wnt1 e 4 no dorso do TN, foi identificada a expressão de Wnt11 no lábio dorsomedial do dermomiótomo (Fig. 16D). Curiosamente a expressão de Wnt11 segue um padrão muito semelhante à expressão de Noggin, localizando-se no lábio dorsomedial do dermomiótomo aproximadamente no mesmo momento em que as células da CNT iniciam sua migração pela rota lateral.

Analisando em conjunto, esses padrões de expressão de Wnt e antagonistas, foi evidenciado um cenário bastante interessante: no momento em que as células da CNT iniciam sua migração pela rota dorso lateral para formar as células progenitoras de melanócitos, o lábio dorsomedial do dermomiótomo passa a expressar Dkk1 e Wnt11 ao mesmo tempo no TN a expressão de Wnt1 e 4 continua alta. Portanto a próxima pergunta foi se de alguma forma Wnt1 e 4 expressos pelo dorso do TN estavam sendo bloqueadas por Dkk1. E, seria Wnt11 um dos responsáveis pela migração da CNT pela rota lateral? Wnt1 e 4, expressos na região dorsal do TN, são proteínas que interagem com Frizzled e Lrp, sendo portanto susceptíveis ao bloqueio por Dkk1. Já Wnt11 faz interação via Frizzled e Frl, não sendo bloqueado por Dkk1 (TAO et al., 2005). Simões-Costa e colaboradores (2015) mostram que o bloqueio de Wnt1, faz com que Axud1, proteína ativadora de *FoxD3*, não seja ativada, mostrando que o bloqueio de Wnt1 poderia ser um dos responsáveis pela diminuição de FoxD3 no progenitor de melanócito. Já Wang e colaboradores (2019) mostram que Wnt11 parece ser importante para a síntese de melanina pelos melanoblastos.

Realizando análises de associações entre Wnt11 e FoxD3, não foi observado associações relevantes. Curiosamente, ao testar a associação entre Wnt11 e Mitf, foi observada uma baixa associação, essa, no entanto, via Lef1 (Fig. 23A). Na tentativa de incrementar esses dados, esses testes de associações foi repetido utilizando bancos de dados humanos. Essa análise mostrou uma forte associação entre Wnt11 e a enzima Tirosinase, elemento chave a via de síntese da melanina (Fig. 23B)

Figura 23 – Análise de interações entre Mitf e Wnt em camundongos e humanos

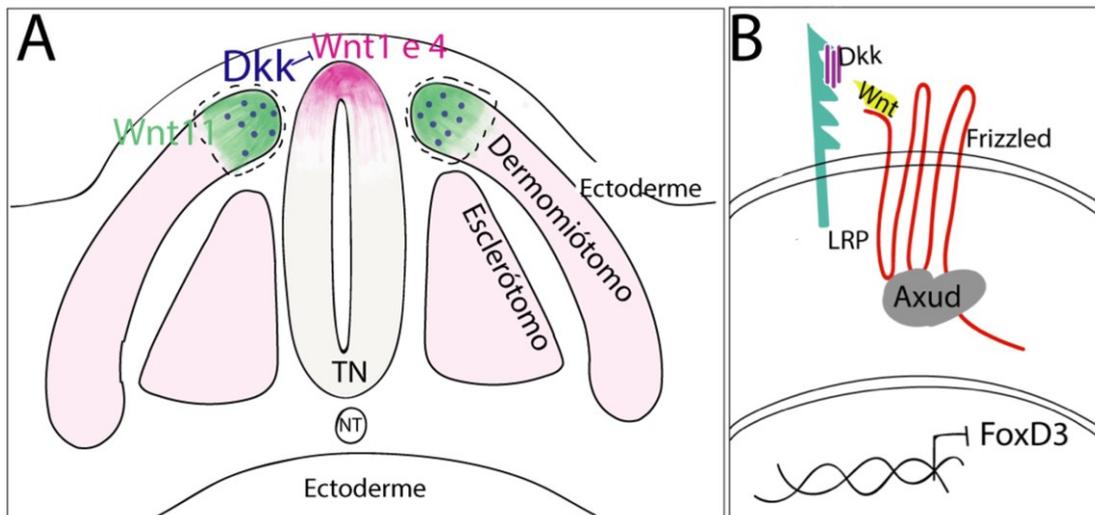


Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Análise das interações entre as proteínas alvo (círculos preto) Wnt11 e Mitf em camundongos (A) e em humanos (B). Cada cor de linha descreve uma relação, conforme apresentado à direita. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/wnt11/mitf/> e <https://genemania.org/search/homo-sapiens/wnt11/mitf/>. Acesso em: 24/01/2020

Em conjunto essas informações nos permitem inferir que para que as células da CNT migrem pela rota dorso-lateral é necessário que Wnt1 e 4 sejam bloqueados via Dkk1 (Fig. 24) e apesar de não haver ligação direta entre Wnt11 e Mitf, há possíveis interações entre essas proteínas via Lef1, em camundongos ou em humanos, via Tirosinase. Essa última, fundamental para a produção de melanina.

Figura 24 – Conclusões da hipótese 2



Fonte: Produzido pela autora (2020) e a partir de Simões-Costa; Stone; Bronner, 2015.

Nota: Esquema com as principais conclusões da hipótese 2. (A) Dkk expresso pelo lábio dorsomedial do dermomiótomo (tracejado) bloqueia Wnt1 e 4 expresso pelo dorso do TN. Com o bloqueio de Wnt1 (B) Axud não conseguiria ativar o começo da transcrição de FoxD3. (TN) Tubo neural, (NT) notocorda.

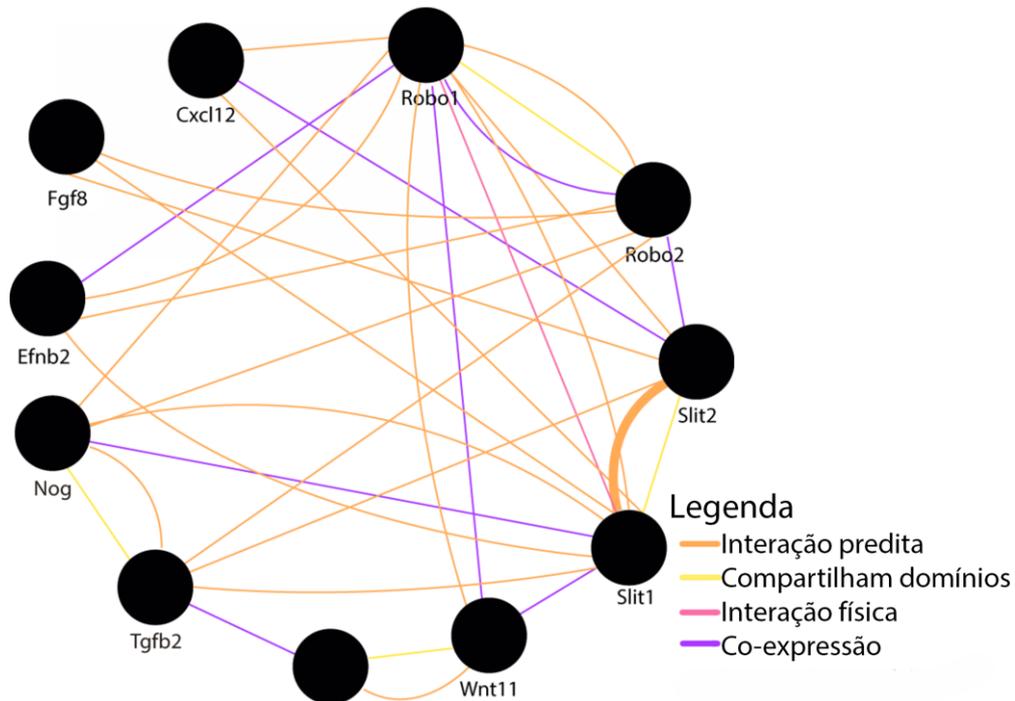
3.4 HIPÓTESE 3: WNT11, NOGGIN E DKK1 SÃO RESPONSÁVEIS PELA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SLIT1 E 2 E POR FIM, A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.

Nas fases iniciais de migração, as células da CNT expressam os receptores Robo1 e 2. O seu ligante Slit é expresso na parte dorsal dos somitos. A sinalização Robo/Slit é repulsiva para a migração das células da CNT, impedindo-as de migrarem pela rota lateral nos estágios iniciais (JIA; CHENG; RAPER, 2005). No entanto, a expressão de Slit é reduzida gradativamente até desaparecer totalmente. Paralelamente a isso, as células da CNT reduzem a expressão de Robo1 e 2 durante a migração lateral. Jia e colaboradores (2005) mostraram que células progenitoras de melanócitos expressando um dominante negativo de Robo1 migram pela via ventral normalmente, mostrando que a via Robo/Slit parece ser decisiva na migração lateral. Essa nova configuração molecular permite que as células da CNT migrem pela rota lateral. Entretanto, os mecanismos moleculares que levam à redução na expressão de Robo/Slit, durante a migração da CNT, não são conhecidos.

Para tentar entender quais fatores poderiam estar controlando a redução na sinalização Robo/Slit na CNT, foi realizada uma ampla busca nas plataformas supracitadas com as proteínas solúveis já descritas. Os resultados estão apresentados na tabela 1. Dentre os resultados mais promissores estão o Noggin, Wnt11 e Fgf8. A análise do perfil de expressão dessas proteínas nos levou a criar a hipótese de que a diminuição na expressão de Robo/Slits poderia ser causada por algum dos cenários moleculares protagonizados por Wnt11, Noggin ou Dkk1.

Ao pesquisar a interação das proteínas expressas durante a diminuição da expressão de Slit/Robo, foram encontrados os seguintes resultados (Fig. 25).

Figura 25 – Análise da interação da sinalização Slit/Robo com as proteínas presentes durante a migração das células progenitoras de melanócitos



Fonte: Produzida pela autora (2020).

Nota: Análise da interação das proteínas presentes durante a migração dos progenitores de melanócitos com Slit1 e 2 e Robo1 e 2. Cada cor de linha descreve uma relação, conforme apresentado à direita. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/efnb2/tgfb2/cxcl12/fgf8/slit1/slit2/wnt11/wnt5b/nog/> Acesso em: 24/01/2020.

Já ao pesquisar artigos que relacionassem essas proteínas, foi observado que a interação entre Wnt5b, EphrinB2, Fgf8, Dkk1 x Slit1 e 2 não apresentaram nenhum resultado. Ao pesquisar a interação entre Wnt11, Tgfb2 x Slit1 e 2 apresentaram resultados, porém nenhum é relevante para essa pesquisa, já que trata-se de sequenciamento de tumores, proteômica do desenvolvimento de rins ou ainda experimentos com análise paralela dessas proteínas. A análise de Cxcl12 com Slit/Robo se mostrou mais promissora, já que mostra que Slit2 é capaz de modular a expressão de Cxcl12 em células do sistema imune. As demais proteínas, quando analisadas com Robo1 e 2, não apresentaram resultados ou não foram relevantes para essa pesquisa.

Sabendo que durante o intervalo de migração das células da CNT, o dorso do TN expressa Wnt1 e Wnt4 continuamente, a primeira pergunta a ser respondida foi se o bloqueio de Wnt1 e 4 por Dkk1 poderia reduzir a expressão de Robo/Slit. Foi realizado um levantamento no site PubMed® a fim de associar as proteínas Wnt1 e 4 com Slit/Robo, onde foi pesquisado o termo “Wnt1 [TIAB] AND (Slit1 [TIAB] OR Slit2 [TIAB])” e encontrado

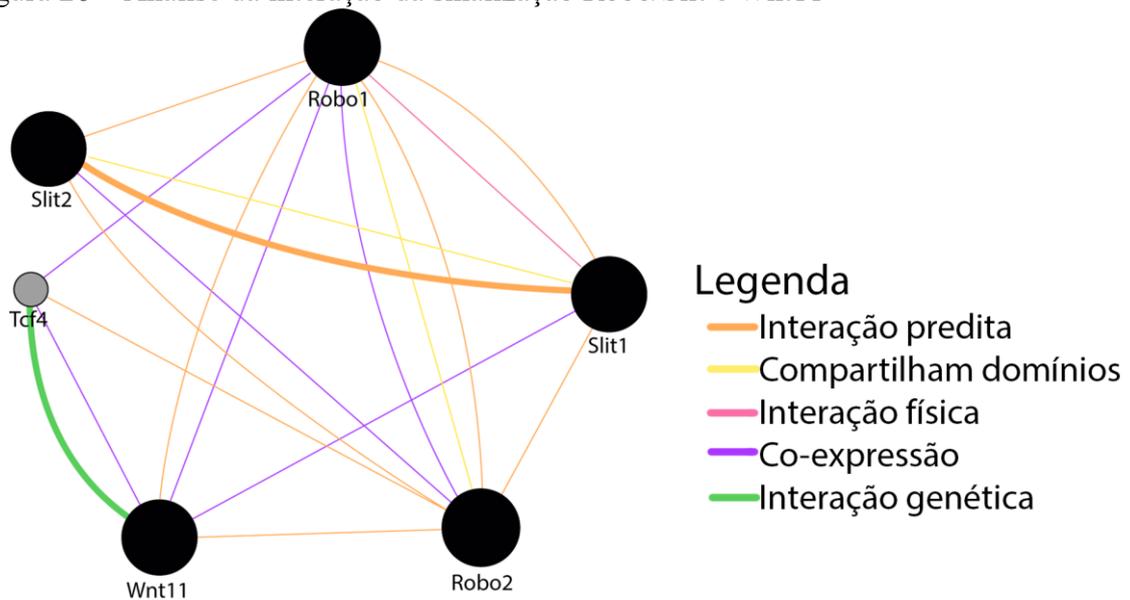
um único artigo no qual citava Wnt1 e Slit2, porém, não havia análise de interação entre eles. Já ao pesquisar a correlação de Wnt1 e Robo1 e 2 através do termo “Wnt1 [TIAB] AND (Robo1 [TIAB] OR Robo2 [TIAB])” foram encontrados dois resultados, entretanto ambos citavam Wnt1 apenas como um promotor utilizado em sistemas de Cre/LoxP ou um modelo de tumor induzido por Wnt1, não apresentando correlação com o presente trabalho. Ao pesquisar o termo “Wnt4 [TIAB] AND (Slit1 [TIAB] OR Slit2 [TIAB])” ou “Wnt4 [TIAB] AND (Robo1 [TIAB] OR Robo2 [TIAB])” não foi encontrado nenhum resultado. No entanto ao pesquisar no GeneMania[®] (SZKLARCZYK et al., 2019) as proteínas Wnt1 e 4 com Slit/Robo a fim de buscar uma correlação entre elas, é possível encontrar os resultados da tabela 2.

Tabela 2 – Interações entre Wnts e Robos/Slits

	Wnt1	Wnt4
Slit1	Via Lrp5 e 6 e Wif1	Não há interação
Slit2	Via Lpr5, 6 e Wnt11, Wif1	Interação direta e via Wnt11
Robo1	Via Lrp5	Interação direta
Robo2	Via Lrp6	Interação direta

A próxima pergunta foi se o início da expressão de Wnt11 poderia estar relacionada à repressão de Slit nos somitos. Então foi realizada uma pesquisa no site PubMed[®] com o termo “Wnt11[TIAB] AND (Robo1 [TIAB] OR Robo2[TIAB])” e “Wnt11[TIAB] AND (Slit1 [TIAB] OR Slit2[TIAB])”, onde foi encontrado um artigo, no qual apontava a ação dessas proteínas no desenvolvimento dos rins, não apresentando correlação com o trabalho. Já ao pesquisar a correlação de Wnt11 com Slit/Robo no site GeneMania[®] (SZKLARCZYK et al., 2019) foi observado uma correlação entre Wnt11 e Robo1 e 2 via o receptor Tcf4 (Fig. 26).

Figura 26 – Análise da interação da sinalização Robo/Slit e Wnt11



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Análise da interação de Slit1 e 2, Robo1 e 2 e Wnt11, no qual podemos ver interações preditas entre Robos e Wnt11 (linha laranja) e co-expressão entre Robo1, Slits e Wnt11 (linha roxa). Cada cor de linha descreve uma relação, conforme apresentado à direita. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/slit1/slit2/wnt11/robo1/robo2/>. Acesso em: 24/01/2020

A próxima pergunta realizada foi se a medialização de Noggin ou a redução de Bmp4 e 7 eram responsáveis pela redução de Slit1 e 2. Assim, foi realizada uma pesquisa no site GeneMania® (SZKLARCZYK et al., 2019) a fim de saber se haveria alguma correlação entre esses fatores, onde foram encontrados os seguintes resultados (Tabela 3).

Tabela 3 – Interações entre Slits e Bmp/Noggin

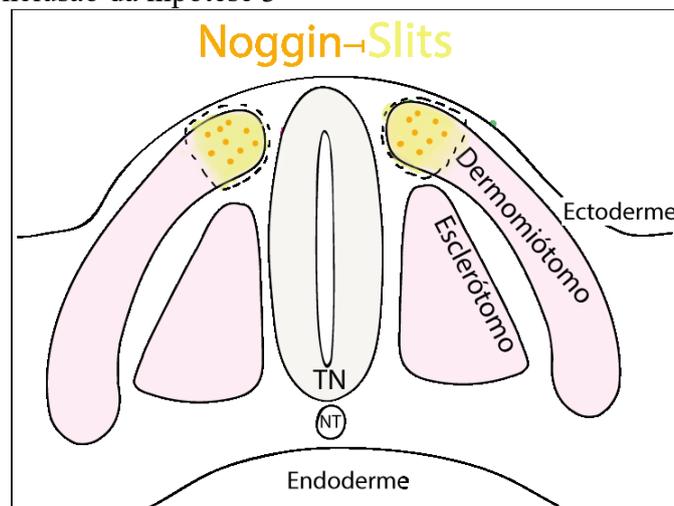
	Slit1	Slit2
Bmp4	Interação direta e via Gemlin2, Chordin e Noggin.	Via Gremlin2 e Chordin.
Bmp7	Via Chordin e Noggin	Via Chordin.
Noggin	Interação direta	Não há interações.

Foi realizada a pesquisa no site PubMed® com os seguintes termos “(Slit1 [TIAB] OR Slit2[TIAB]) AND (Bmp4 [TIAB] OR Bmp7 [TIAB])” ou “(Slit1 [TIAB] OR Slit2 [TIAB] AND Noggin[TIAB]”, porém, apenas foi encontrado um resultado, um artigo no qual o tema é desenvolvimento nervoso central e cita que a via do Bmp4 e de Slit1 são importantes para o neurodesenvolvimento. Ao pesquisarmos a correlação de Slit 1 e 2 com Gremlin2, Chordin ou Noggin, também não é possível encontrarmos resultados. Porém, Tumelty et al., 2018, mostra que Gremlin, um dos antagonistas de Bmp, como Noggin, é capaz de interagir com o domínio

D2 de Slits, inibindo sua ação. Logo após, Bmp seria responsável por regular negativamente a expressão de *Slit*. Nos levou a inferir que Noggin possa ter o mesmo efeito que Gremlin em Slit, já que ambos atuam de forma análoga.

Desta forma, estas informações nos permite inferir que apesar de não haver dados bibliográficos sobre a interação de Slit com as proteínas supracitadas, Noggin pode ser uma das proteínas responsáveis pela redução de Sli (Fig. 27).

Figura 27 – Principal conclusão da hipótese 3



Fonte: Produzido pela autora (2020).

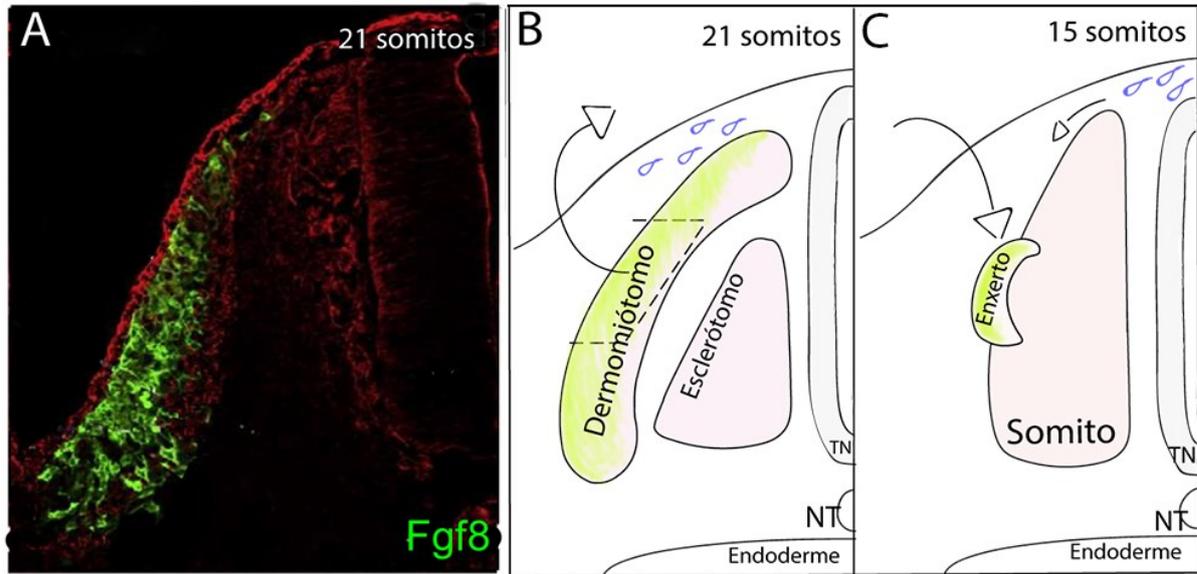
Nota: As Slits presentes no lábio dorsomedial do dermomiótomo (tracejado) podem ser bloqueadas pela chegada de Noggin, presente no mesmo local. (TN) Tubo neural, (NT) notocorda e lábio dorsomedial do dermomiótomo na região tracejada.

3.5 HIPÓTESE 4: FGF8 PODE SER QUIMIOATRATIVO PARA AS CÉLULAS DA CNT.

O Fgf8 é uma proteína solúvel que controla diferentes processos durante o desenvolvimento embrionário. Creuzet e colaboradores (2004) mostraram que Fgf8 é um potente fator quimiotático para as células da CN cranial. Já Sato et al., 2008 mostram que a CN cardíaca migra para a região medial do embrião seguindo um gradiente de Fgf8. Na região truncal do embrião, Fgf8 é expresso na região central do dermomiótomo (Fig. 28A), no momento em que as células da CNT progenitoras de melanócitos começam a migrar. Esta região parece ser muito importante para a migração das células da CNT pela rota lateral. Ao remover cirurgicamente essa região, Tosney (2004) observou um atraso na migração das células da CNT pela rota lateral. Implantando a parte central do dermomiótomo de embriões mais velhos, em embriões nos quais as células da CNT ainda não haviam iniciado a migração

pela rota lateral, foi observado que imediatamente após o implante as células da CNT começaram a migrar pela rota lateral, concluindo que há fatores, nessa região, decisivos para habilitar as células da CNT a migrarem pela rota lateral (Fig. 28B-C)

Figura 28 – Expressão de Fgf8 no dermomiótomo durante o desenvolvimento



Fonte: Produzido pela autora (2020) e DELFINI et al., 2009.

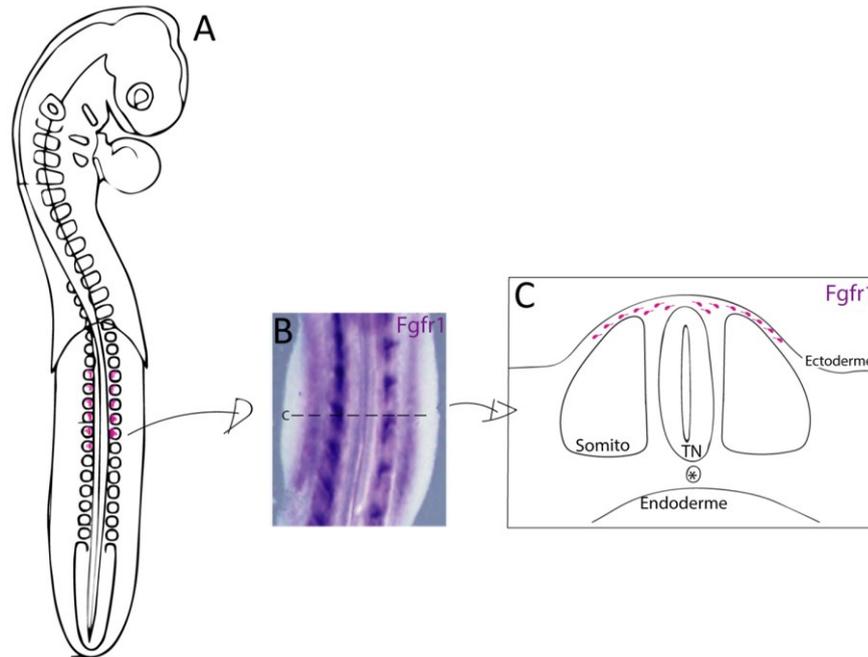
Nota: (A) Expressão de Fgf8 no dermomiótomo (em verde) e experimento realizado por Tolsney (2004) onde a autora retira parte do somito de um embrião mais velho, essa região expressa diferentes fatores, dentre eles Fgf8 (B). Neste momento as células progenitoras de melanócitos já estão migrando e inserem na região mesma região em um embrião mais novo, no momento em que as primeiras células da CNT estão migrando e observa que as células migram para a rota dorsal (C). (NT) Notocorda, (TN) tubo neural.

A partir destes dados, foi realizada a seguinte pergunta: O Fgf8 expresso pela região central do dermomiótomo poderia participar da quimiotaxia ou da capacitação das células da CNT para migrarem pela rota lateral? Logo, foi realizada uma busca se os receptores de Fgf8 (Fgfr1-4) seriam expressos pelas células da CNT que migram pela rota lateral. Os receptores Fgfr 1 são expressos por essas células (Fig. 29A-C). Mostrando que Fgf8 seria um candidato para induzir a migração de progenitores de melanócitos. Consequentemente, a próxima pergunta foi se o Fgf8, de alguma forma, poderia induzir as células da CNT progenitoras de melanócitos a migrar pela rota lateral, tornando-os competentes. Para responder essa pergunta foi utilizado o site GeneMania[®] para analisar a interação de Fgf8 com proteínas que já são conhecidas por influenciar na migração dos progenitores de melanócitos: FoxD3, Robo1 e 2, EdnrB2/EdnrB e Mitf (tabela 4).

Tabela 4 – Análise da interação de Fgf8 com Robos, Foxd3, EdnrB e Mitf

	FoxD3	Robo1	Robo2	EdnrB	Mitf
Fgf8	Não há interações	Via Slit1	Interação direta	Interação direta e via Edn3 e Fgfr1.	Interação direta e via Lef1 e Fgfr1

Figura 29 – Expressão de Fgfr1 nas células da CNT



Fonte: Produzido pela autora (2020) e http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=460369.

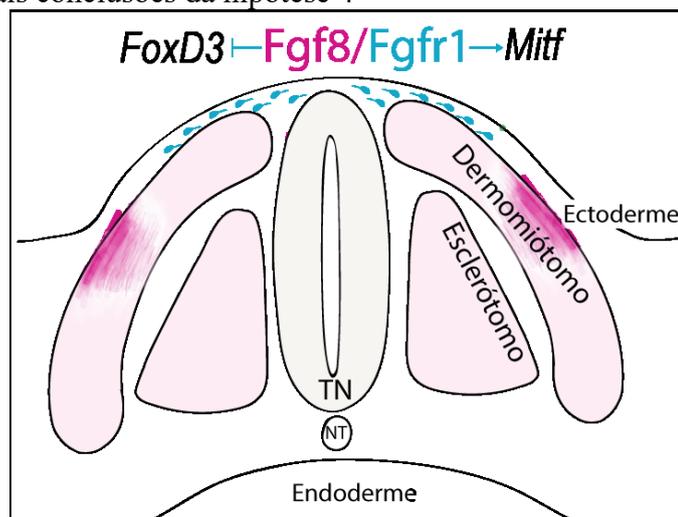
Nota: Representação da expressão de Fgfr1, onde em (A) ilustração mostrando o local de expressão de Fgfr1. (B) Expressão *in vivo* de Fgfr1 e (C) a representação de um corte transversal mostrando a expressão de Fgfr1 nas células da CNT. (TN) Tubo neural, (*) notocorda.

Ao pesquisar o termo “Fgf8 [TIAB] AND FoxD3[TIAB]” no site PubMed®, foram encontrados 4 resultados, onde 3 desses trabalhos não são relevantes para este presente trabalho, pois não comparam a ação e expressão dos fatores supracitados. Entretanto Monsoro-Burq e colaboradores (2003) mostram que Fgf8 é capaz de induzir, de forma momentânea, a expressão de FoxD3 em *Xenopus l*. Já ao pesquisar a correlação de Fgf8 com Robo1 e 2 através do termo “Fgf8[TIAB] AND (Robo1[TIAB] OR Robo2[TIAB])” foi encontrado um resultado, que diz respeito a um estudo com sarcomas e não apresenta dados relevantes para esse estudo. O termo “Fgf8[TIAB] AND (EdnrB[TIAB] OR EdnrB2[TIAB])” nos mostra que Welsh & O’Brien (2000) observaram que camundongos com a deleção de EdnrB apresentam uma diminuição drástica na expressão de Fgf8.

A busca pelo termo “Fgf8[TIAB] AND Mitf[TIAB]” nos levou a 3 resultados, onde mostram que Fgf8 exógeno durante a formação do olho de embriões de galinha leva a uma perda na expressão de Mitf (HALILAGIC et al., 2007; KOBAYASHI; YASUDA; ARAKI, 2010; VOGEL-HÖPKER et al., 2000). Entretanto ao pesquisar os termos “Fgf8[TIAB] AND Lef1[TIAB]”, já que é possível que a ação de Fgf8 seja indireta sobre Mitf, encontramos 8 resultados, 7 desses apenas mostram Fgf8 e Lef1 como resultados paralelos. Contudo, Eblagie e colaboradores (2004) mostram que Fgf8 exógeno induz a expressão de Lef1 no desenvolvimento de glândulas mamárias de camundongos. Já ao realizar o bloqueio de Fgfr1, não há expressão de Lef1, mostrando que a indução da expressão de Lef1 ocorre através Fgf8 via Fgfr1. Inferindo que, talvez, a ação de Fgf8 ative a expressão de Lef1 e esta leve à migração pela rota lateral e o começo da diferenciação celular. A pesquisa com os termos “Fgf8[TIAB] AND Slit1[TIAB]” apresentou apenas um resultado, no qual relatam Slit1 e Fgf8 em experimentos paralelos. Ao pesquisar os termos “Fgf8[TIAB] AND Edn3[TIAB]” não foram encontrados resultados.

Portanto, é possível inferir que Fgf8 pode ser um possível fator quimiotático para as células da CNT, já que essas possuem Fgfr1 e 3, ou ainda, influenciar na transcrição de genes relacionados com a diferenciação de melanócitos, como *FoxD3* ou *Mitf* (Fig. 30). Apesar de haver poucos dados sobre a ação de Fgf8, foi observado, também, que Fgf8 parece atuar de forma bloqueadora na expressão de Mitf.

Figura 30 – Principais conclusões da hipótese 4



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: O Fgf8 expresso pela região medial do somito atrai as células da CNT que expressam Fgfr1, isso ativaria a transcrição de Mitf e/ou o bloqueio de FoxD3.

4 DISCUSSÃO

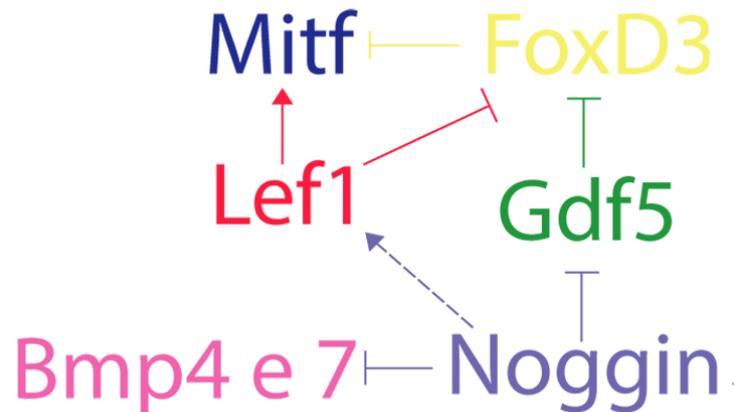
Os melanócitos são células pigmentares encontradas na pele e penas de vertebrados. O desenvolvimento dos melanócitos inicia-se com a migração das células da CN (KUKLENSKI, 1915; MAKITA; MOCHIZUKI, 1984; MUROYA et al., 2000). Dependendo da rota migratória que essas células seguirem, receberão as informações moleculares necessárias para conduzir sua diferenciação. A grande maioria das células da CNT migram via rotas ventrais, no entanto a última população de células da CNT a migrarem alteram drasticamente sua rota de migração, passando a migrar por uma rota lateral. Essas células formarão, na sua grande maioria, melanócitos. Curiosamente, os mecanismos moleculares que controlam essa mudança de rota migratória, não são completamente conhecidos. A grande maioria das informações são isoladas e desconectadas entre si.

Para melhor compreender a mudança do perfil migratório das células da CNT que formarão os melanócitos (células que migram pela rota lateral), foi realizada uma extensa revisão bibliográfica a fim de encontrar as principais proteínas envolvidas na migração das células da CNT. Depois disso, foram verificadas possíveis interações dessas proteínas com as vias de sinalização já descritas como associadas à migração lateral da CNT e diferenciação de melanócitos. Com essas informações, foram criadas quatro hipóteses para tentar responder o porquê da mudança de migração. Numa última etapa foram utilizadas ferramentas *in silico* para testar, na medida do possível, tais hipóteses.

Já é conhecido que as células da CNT que passam a migrar pela rota lateral, antes disso, apresentaram um aumento na expressão de Lef1 (KURIYAMA; MAYOR, 2008). Nossas análises mostraram que Noggin (um potente antagonista de Bmp) passa a ser expresso no lábio dorsomedial do dermomiótomo (região anatomicamente muito próxima ao dorso do TN – local de início de migração das células da CN). Durante a migração da CNT, o dorso do TN expressa Bmp4 e 7. Na hipótese 1, temos que o bloqueio do Bmp4 e 7 por Noggin pode ser um dos responsáveis pelo aumento de Lef1 e assim, desencadear a migração das células da CNT pela rota lateral. As análises realizadas mostraram que realmente a sinalização Bmp pode atuar como um repressor de Lef1. Além disso, foi observado que Lef1 tem alta afinidade por Mitf, principal regulador da diferenciação de melanócitos (SEBERG; VAN OTTERLOO; CORNELL, 2017). Outro dado já conhecido é que as células da CNT que iniciarão sua migração pela rota lateral perdem a expressão de FoxD3 (conhecido bloqueador de Mitf) (NITZAN et al., 2012). A chegada de Noggin no lábio dorsomedial do dermomiótomo pode

ser um dos responsáveis pela diminuição de FoxD3. Nossas análises mostraram que FoxD3 é fortemente estimulado por Gdf5, já Noggin é capaz de bloquear Gdf5. Dessa forma, via bloqueio de Gdf5, Noggin poderia ser o responsável pela redução na expressão de FoxD3 (Fig. 31).

Figura 31 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 1



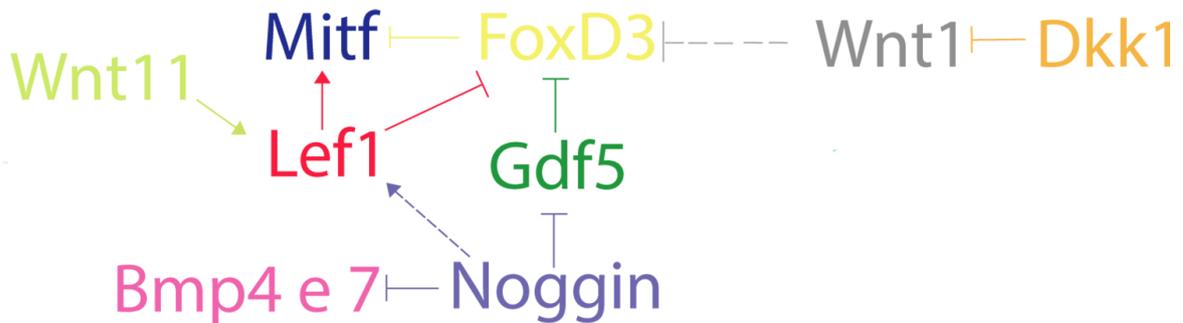
Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Noggin é capaz de bloquear Gdf5, que por consequência, bloquearia FoxD3 e com isso, Mitf poderia ser expresso. O bloqueio de Bmp4 e 7 por Noggin, permite a expressão de Lef1, que atua na transcrição de Mitf, este último e Foxd3 atuam bloqueando-se reciprocamente.

Em nossas análises também constatamos que Wnt11 apresenta um padrão de expressão anatômico-temporalmente compatível com a migração das células da CNT pela rota lateral. Sendo assim, teorizamos, a hipótese 2, que Wnt11 seria um dos responsáveis pela migração das células da CNT pela rota lateral. Durante as análises foi observado que Dkk1, antagonista clássico da via Wnt, é expresso nos somitos, em posição muito próxima ao dorso do TN, no mesmo momento em que Wnt11 também é expresso (CHAMPMAN, 2018). Inicialmente esses dados podem parecer incoerentes, entretanto, Dkk1 poderia ser capaz de bloquear Wnt1 e 4 (expressos no dorso do TN) e não Wnt11 (MIKELS; NUSSE, 2006). Tao e colaboradores (2005) mostraram que Dkk1 atua nos receptores Lrp, e não Flr, receptores com maior afinidade por Wnt11. Simões-Costa e colaboradores (2015) descrevem que o bloqueio de Wnt1 não ativaria FoxD3, ou ainda a expressão de Wnt11 parece ser vital para a síntese de melanina (WANG et al., 2019), indicando que apesar não haver pesquisas estudando a interação direta ou indireta de FoxD3 e Wnt11, de alguma maneira, ele poderia ser um dos responsáveis pelo início da migração das células progenitoras de melanócitos,

concomitantemente com o bloqueio de Wnt1, que auxiliaria indiretamente ao bloqueio de FoxD3 (Fig. 38).

Figura 32 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 2

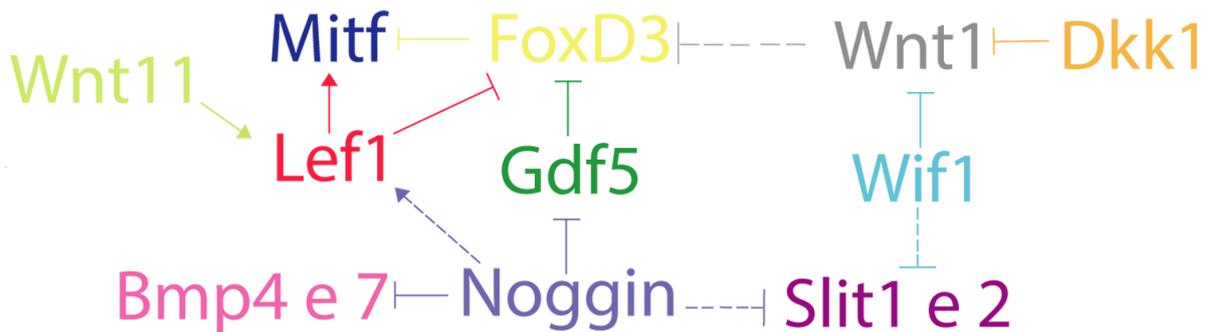


Fonte: Produzida pela autora (2020).

Nota: O bloqueio de Wnt1 por Dkk1 faz com que FoxD3 também seja bloqueado. Wnt11 parece ser um dos ativadores de Lef1.

É bem conhecido que as células da CNT que migram pela rota lateral reduzem a expressão de Slits (JIA; CHENG; RAPER, 2005b). Na hipótese 3 buscamos relacionar o cenário molecular identificado em nossas análises (sinalização Bmp, Wnt e Robo) com a diminuição da expressão das Slits, no momento em que as células da CNT migram pela rota lateral. Foram observadas interações moleculares indiretas entre Bmp4 e 7 (expressos pelo dorso do TN) com Slits via seus antagonistas, Noggin, Gremlin e Chordin. O mesmo foi observado com Wnt1 (expresso no dorso do TN), cuja a ligação molecular com Slits foi observada via seu antagonista, Wif1. Além disso, observamos ligações moleculares entre os ligantes clássicos de Slits, as proteínas Robo, com receptores da sinalização Wnt, Lrp5 e 6. Apesar de não haver interação direta entre Slits x Wnts e Slits x Bmps, podemos hipotetizar que o bloqueio de Slits se dê via proteínas intermediárias, como Noggin, Gremlin, Chordin, Lrp5 e 6 e Wif1 (Tabela 3), e não diretamente com Bmps e Wnts, já que Tulmelty e colaboradores (2018) mostraram que Gremlin é capaz de inibir a ação de Slits, por interação com o domínio D2 do mesmo. A interação de Slits com os antagonistas da via Bmp e da Wnt indicam que, talvez, o bloqueio dessas acarretaria na diminuição de Slits no microambiente no momento em que as células da CNT que seguirão pela rota lateral iniciam sua migração.

Figura 33 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 3

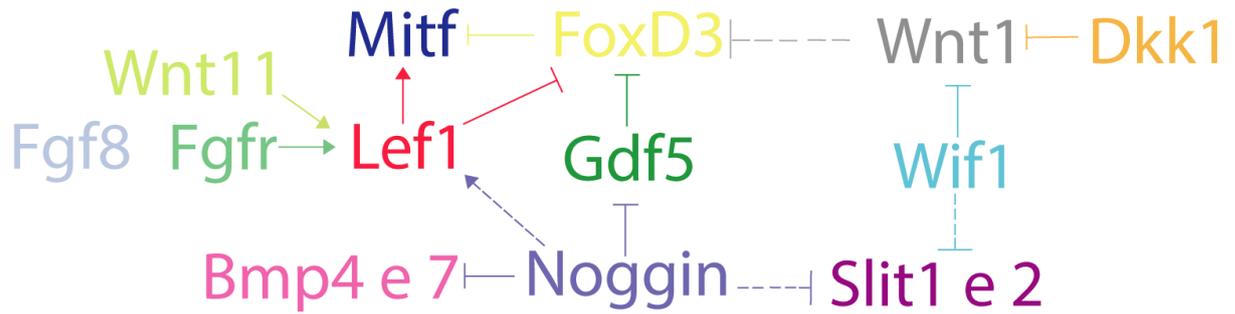


Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: Wif1 ao bloquear Wnt1, bloqueia indiretamente Slit1 e 2, atuando da mesma forma, indiretamente Noggin parece inibir Slit1 e 2 ao bloquear Bmp4 e 7.

A hipótese 4 foi criada a partir da teoria de que Fgf8 poderia ser um fator quimiotático para as células da CNT migrarem pela rota lateral. Investigadoras mostraram que Fgf8 é quimioatrativo nas células da CN cefálica (CREUZET et al., 2004), ou para a crista neural cardíaca (SATO et al., 2011). Paralelo a isso, Tosney (2004) demonstra que as células recém saídas do TN são atraídas para a rota lateral quando implantado um enxerto de dermomiótomo mais velho na região lateral do embrião, levando a inferir que há fatores expressos naquele local que possam atrair as células da CNT. Até hoje, não se sabe ao certo quais fatores que estão presentes nessa região do dermomiótomo que seriam capazes de atrair as células da CNT. Entretanto, em nossas análises observamos que Fgf8 é expresso na mesma região do dermomiótomo transplantada por Tosney em 2004 (DELFINI et al., 2009). Isso coincide com o momento em que as células da CNT iniciam sua migração pela rota lateral. Em nossas análises não foram observadas relações diretas entre Fgf8 e Mitf, porém há interações via Fgfr1 e Lef1, levando a hipotetizar que, talvez, a ação do Fgf8 seja quando ele se liga ao Fgfr1, ativando *Mitf* via Lef1. Eblaghie e colaboradores (2004) mostram que o bloqueio de Fgf8 via Fgfr1 bloqueia também a expressão de Lef1 em células mamárias de embriões de camundongo. Ou ainda a interação de EdnrB (proteínas expressas pelas células da CNT que iniciam sua migração pela rota lateral) e Fgf8 parece ser via Fgfr1 e Edn3, onde Fgf8 se ligaria a Fgfr1 e sinalizaria para a célula para começar a expressar EdnrB e então, a Edn3 se ligaria a EdnrB e assim, começaria a expressão de genes como *Mitf* (Fig. 34).

Figura 34 – Rede regulatória criada a partir da hipótese 4



Fonte: Produzido pela autora (2020)

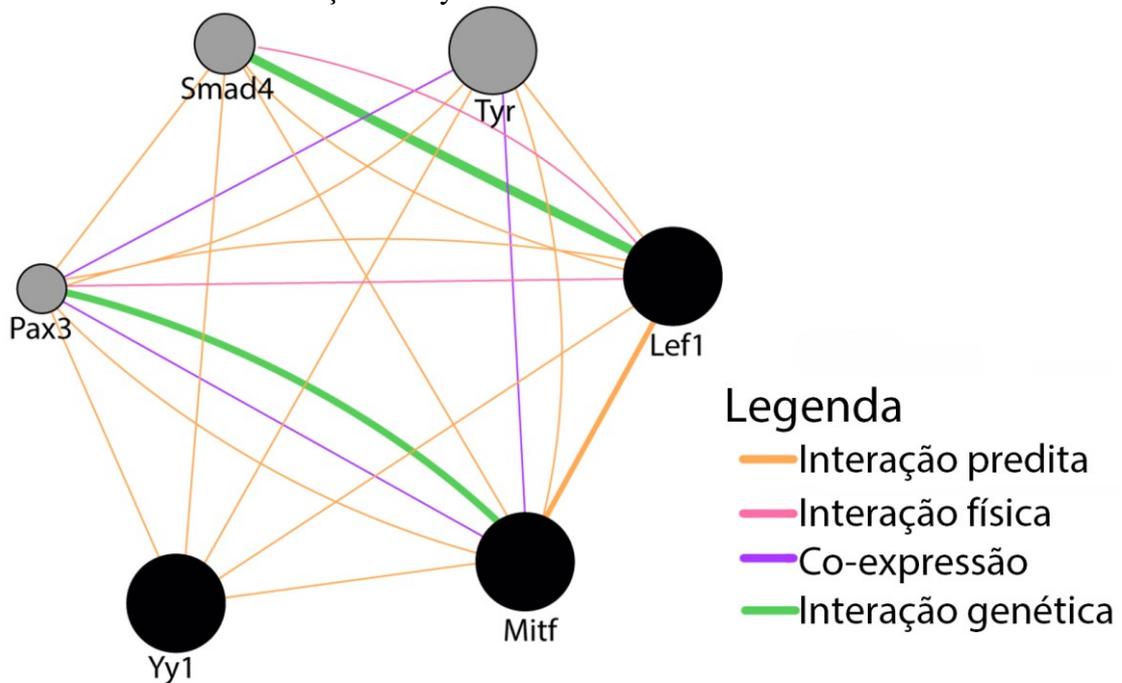
Nota: Fgf8 parece se ligar em Fgfr1 presente nas células da CNT e assim, ativar Lef1.

Apesar de nesse trabalho terem sido abordadas 4 hipóteses separadamente, é possível observar que elas interagem entre si e fazem parte de uma complexa rede regulatória, com diferentes mecanismos redundantes. Um exemplo disso seria a ativação de Lef1 por Fgf8 via Fgfr1 ou Wnt11, ou ainda indiretamente pelo bloqueio de Bmp4 e 7. Os diferentes mecanismos de ativação de Lef1 sugere que ele seja extremamente importante durante a migração das células da CNT pela rota lateral, mostrando que talvez Lef1 seja um dos ativadores de *Mitf*. Outro mecanismo redundante encontrado neste trabalho foi o bloqueio de FoxD3 via repressão de Gdnf5 por Noggin ou ainda pela inibição de Wnt1 por Wif1 ou Dkk1, mostrando a importância na diminuição na expressão de FoxD3, já que sua expressão reprime a expressão de *Mitf* e *EdnrB2* (THOMAS; ERICKSON, 2009). Análises desse trabalho mostram também que Wif1 e Noggin podem ser responsáveis pela diminuição de Slit1 e 2, já que indiferentemente, bloqueio de Bmps e Wnts podem influenciar na diminuição de Slits e sua repressão é importante para a migração das células da CNT pela rota lateral, já que as Slits atuam como quimio repelentes.

Yang1 (Yy1) é um fator de transcrição pouco estudado durante a migração de células da CNT pela rota lateral, entretanto, possui diferentes funções, como iniciador, ou seja, Yy1 liga-se à proteína que inicia a transcrição dos genes alvos (SHI; LEE; GALVIN, 1997). Li e colaboradores (2012) mostraram que Yy1 é capaz de interagir com a região B-HLH-Zip de *Mitf*, e assim ativar a diferenciação de melanócitos. Ao analisar a interação de Yy1 com Lef1 e *Mitf*, observamos que ambos possuem interações preditas, levando a inferir que Yy1 e Lef1 atuem em conjunto para a ativação de *Mitf*, já que Yy1 possui interação com *Mitf* e Lef1. Mais evidências que Yy1 esteja relacionado com a transcrição de *Mitf* é que simultaneamente

com Lef1, Yy1 apresenta interação com Smad4, Tyr e Pax3, todas essas, proteínas envolvidas na migração pela rota lateral e início da diferenciação de melanócitos (Fig.35).

Figura 35 – Análise da interação de Yy1 com Lef1 e Mitf

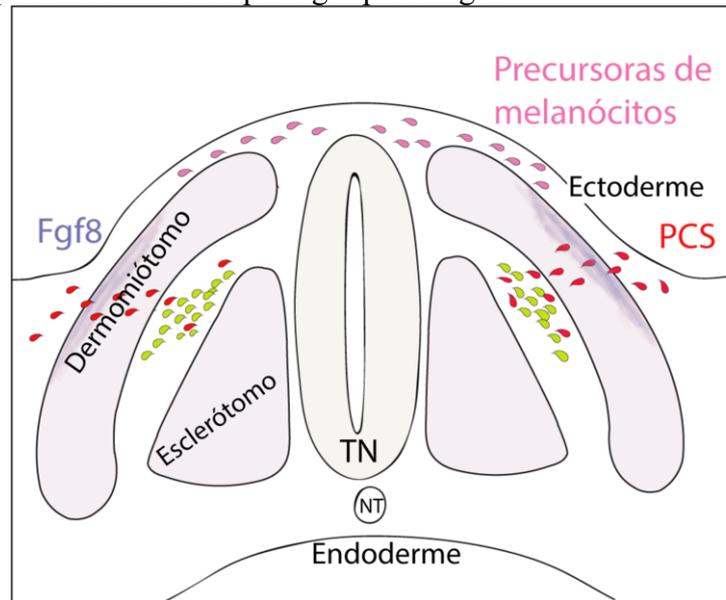


Fonte: Produzido pela autora (2020)

Nota: Análise da interação de Lef1, Mitf e Yy1, onde observamos que Yy1 possui interação com Lef1, Mitf, Pax3, Smad4 Tyr. Análise original disponível em: <https://genemania.org/search/mus-musculus/lef1/yy1/mitf>. Acesso em 08/02/2020.

Já o Fgf8, expresso no dermomiótomo no momento da migração dos progenitores de melanócitos, parece ser um fator quimiotático para as células da CNT, para migrarem pela rota lateral, não só as células que saíram da última rota de migração, mas também os progenitores de células da Schwann (PCS). Adameyko e colaboradores (2009) mostram que parte das células PCS saem da sua rota, entre o dermomiótomo e o esclerótomo, atravessam o dermomiótomo e migram pela rota lateral, tal como as células progenitoras de melanócitos (Fig. 36). Até o momento, não há estudos que mostrem quais proteínas estão envolvidas nesse comportamento anômalo das células, entretanto, sabe-se que é o mesmo momento em que o Fgf8 está sendo expresso e os progenitores de melanócitos estão migrando pela rota lateral. Portanto, o Fgf8 expresso pelo dermomiótomo pode ser um fator quimioatrativo para as células da CNT que estão migrando pela rota lateral e possuem Fgfr1, e também para as PCS, que então perto do gânglio da raiz dorsal.

Figura 36 – PCS podem ser atraídas por Fgf8 para migrar



Fonte: Produzido pela autora (2020).

Nota: As células da CNT progenitoras de melanócitos, em rosa, saem do tubo neural que seguem pela rota lateral, atraídas pelo Fgf8, em roxo, produzido pelo dermomiótomo. As PCS, em vermelho, saem do seu local, perto dos gânglios da raiz dorsal, em amarelo, e atravessam o dermomiótomo a partir da quimiotaxia de Fgf8. (TN) Tubo neural, (NT) notocorda.

A CN é uma população multipotente de células, entretanto, ainda não se sabe ao certo quais mecanismos moleculares estão envolvidos na mudança da rota de migração. Esse trabalho apresentou 4 hipóteses para tentar levantar possíveis proteínas que estão presentes e atuando sobre o começo da migração das células da CNT pela rota lateral. Possivelmente a interação das proteínas apresentadas sejam concomitantes, formando uma intrincada rede regulatória, onde mecanismos redundantes atuam de forma conjunta para evitar erros.

5 CONCLUSÃO

- Lef1 e Y1 são possíveis proteínas que podem atuar no começo da transcrição e Mitf;
- O Noggin expresso pelos dermomiótomos podem ser responsáveis pelo bloqueio indireto de FoxD3, via bloqueio de Gdf5, assim como o bloqueio de Bmps via Noggin;
- Bloqueio de Wnt1 via Wif e Dkk1 podem influenciar na diminuição da expressão de Slits;
- Fgf8 expresso pelo dermomiótomo poderia interagir com Fgfr1 expresso nas células da CNT, que ativaria uma cascata de sinalização, fazendo com que a célula da CNT expresse EdnrB2, e assim, migre pela rota lateral.

6 PERSPECTIVAS

- Bloquear a transcrição de Lef1 nas células migratórias da CN e analisar a expressão de Mitf e FoxD3 nas mesmas;
- Implantar microesferas com Fgf8, Dkk, Wnt11 para análise da migração das células da CNT;
- Analisar a expressão das proteínas Gdf5 e Wif1 durante a migração lateral.

7 REFERÊNCIAS

AKIYAMA, T., et al. Immunofluorescence studies on functions of endothelin-endothelin receptors in Medaka fish pigment cells using the specific antibodies. **Pigment Cell Research**, v.15 p.74-7, 2002.

ADAMEYKO, I. et al. Schwann Cell Precursors from Nerve Innervation Are a Cellular Origin of Melanocytes in Skin. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 366–379, 2009.

ARMENTEROS, T. et al. BMP and WNT signalling cooperate through LEF1 in the neuronal specification of adult hippocampal neural stem and progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9241, 2018.

AYBAR, M. J.; MAYOR, R. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. **Current opinion in genetics & development**, v. 12, n. 4, p. 452–458, ago. 2002.

BAE, C.-J.; SAINT-JEANNET, J.-P. Chapter 2 - Induction and Specification of Neural Crest Cells: Extracellular Signals and Transcriptional Switches. In: TRAINOR, P. A. B. T.-N. C. C. (Ed.). . Boston: Academic Press, 2014. p. 27–49.

BELL, C. A; YATSKIEVYCH, T. A; ANTIN, P. B. (2004) GEISHA, a high throughput whole mount in situ hybridization screen in chick embryos. **Devel. Dynamics** 229: 677-687.

BEAUVAIS-JOUNEAU, A. et al. A novel model to study the dorsolateral migration of melanoblasts. **Mechanisms of Development**, v. 89, n. 1–2, p. 3–14, 1999.

BILLON, N. et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2283 LP – 2292, 15 jun. 2007.

BLACK, B. L.; CRIPPS, R. M. Chapter 9.5 - Myocyte Enhancer Factor 2 Transcription Factors in Heart Development and Disease. In: ROSENTHAL, N.; HARVEY, R. P. B. T.-H. D. AND R. (Eds.). . Boston: Academic Press, 2010. p. 673–699.

BONDURAND, N. et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 13, p. 1907–1917, 12 ago. 2000.

BOTCHKAREV, V. A. et al. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. **The Journal of investigative dermatology**, v. 118, n. 1, p. 3–10, jan. 2002.

BOURLAT, S. J. et al. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. **Nature**, v. 444, n. 7115, p. 85–88, 2 nov. 2006.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration

in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Developmental Biology**, v. 115, n. 1, p. 44–55, 1986.

CHELI, Y. et al. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. **Pigment cell & melanoma research**, v. 23, n. 1, p. 27–40, fev. 2010.

CHO, K.-W. et al. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 45, p. 16788–16793, 7 nov. 2006.

CREUZET, S. et al. Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4843–4847, 6 abr. 2004.

CURRAN, K.; RAIBLE, D. W.; LISTER, J. A. Foxd3 controls melanophore specification in the zebrafish neural crest by regulation of Mitf. **Developmental biology**, v. 332, n. 2, p. 408–417, 15 ago. 2009.

DE BELLARD, M. E. et al. Disruption of segmental neural crest migration and ephrin expression in Delta-1 null mice. **Developmental Biology**, v. 249, n. 1, p. 121–130, 2002.

DE BELLARD, M. E.; RAO, Y.; BRONNER-FRASER, M. Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. **The Journal of cell biology**, v. 162, n. 2, p. 269–279, 21 jul. 2003.

DE LEEUW, S. M. et al. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 61, n. 3, p. 106–113, 30 ago. 2001.

DELFINI, M.-C. et al. The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAIL1 pathway. **Developmental Biology**, v. 333, n. 2, p. 229–237, 2009.

DUPIN, E. et al. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: Transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5229–5233, 2003.

DUPIN, E.; CREUZET, S.; LE DOUARIN, N. M. The contribution of the neural crest to the vertebrate body. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 589, p. 96–119, 2006.

DUTTON, K. A. et al. Zebrafish *colourless* encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4113 LP – 4125, 1 nov. 2001.

EBLAGHIE, M. C. et al. Interactions between FGF and Wnt signals and Tbx3 gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos. **Journal of anatomy**, v. 205, n. 1, p. 1–13, jul. 2004.

EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 207–210, jan. 2002.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427–D432, 24 out. 2018.

ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development (Cambridge, England)**, v. 121, n. 3, p. 915–924, mar. 1995.

ETCHEVERS, H. C.; COULY, G.; LE DOUARIN, N. M. Morphogenesis of the Branchial Vascular Sector. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 7, p. 299–304, 2002.

FARACO, C. D. et al. Hyperpigmentation in the silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. **Developmental Dynamics**, v. 220, n. 3, p. 212–225, 2001.

GALIBERT, M. D. et al. Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26894–26900, 17 set. 1999.

GÁMEZ, B.; RODRIGUEZ-CARBALLO, E.; VENTURA, F. **BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation** **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2013. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00087>>

GAMMILL, L. S.; ROFFERS-AGARWAL, J. Division of labor during trunk neural crest development. **Developmental Biology**, v. 344, n. 2, p. 555–565, 2010.

GANS, C.; NORTHCUTT, R. G. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. **Science (New York, N.Y.)**, v. 220, n. 4594, p. 268–273, 15 abr. 1983.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 11TH EDITION 2016. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 173, n. 5, p. 1430, 1 maio 2017.

GRADL, D.; KÜHL, M.; WEDLICH, D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 8, p. 5576–5587, ago. 1999.

HALILAGIC, A. et al. Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. **Developmental biology**, v. 303, n. 1, p. 362–375, 1 mar. 2007.

HARRIS, M. L.; HALL, R.; ERICKSON, C. A. Directing pathfinding along the dorsolateral path - The role of EDNRB2 and EphB2 in overcoming inhibition. **Development**, v. 135, n. 24, p. 4113–4122, 2008.

HAUSWIRTH, R. et al. Mutations in MITF and PAX3 Cause “Splashed White” and Other White Spotting Phenotypes in Horses. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 4, p. e1002653, 12 abr. 2012.

HERBARTH, B. et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 9, p. 5161–5165, 28 abr. 1998.

HERTWIG, P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der Hausmaus. **Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre**, v. 80, n. 1, p. 220–246, 1942.

HOARE, M.; NARITA, M. The Power Behind the Throne: Senescence and the Hallmarks of Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 2, n. 1, p. 175–194, 4 mar. 2018.

HOU, L.; ARNHEITER, H.; PAVAN, W. J. Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 24, p. 9081–9085, 13 jun. 2006.

HUBER, O.; BIERKAMP, C.; KEMLER, R. Cadherins and catenins in development. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 685–691, 1996.

IGNATIUS, M. S. et al. colgate/hdac1 Repression of foxd3 expression is required to permit mitfa-dependent melanogenesis. **Developmental biology**, v. 313, n. 2, p. 568–583, 15 jan. 2008.

IMAI, K. S. et al. Regulatory blueprint for a chordate embryo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5777, p. 1183–1187, 26 maio 2006.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment cell research**, v. 16, n. 5, p. 523–531, out. 2003.

ITO, Y.; HOARE, M.; NARITA, M. Spatial and Temporal Control of Senescence. **Trends in cell biology**, v. 27, n. 11, p. 820–832, nov. 2017.

JACQUEMIN, P. et al. The Transcription Factor Onecut-2 Controls the Microphthalmia-Associated Transcription Factor Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 5, p. 1200–1205, 2001.

JAMORA, C. et al. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 317–322, 2003.

JASRAPURIA-AGRAWAL, S. et al. Contributors. In: TRAINOR, P. A. (Ed.). . **Neural Crest Cells**. Boston: Academic Press, 2014. p. xvii–xviii.

JEFFERY, W. R. Ascidian neural crest-like cells: phylogenetic distribution, relationship to larval complexity, and pigment cell fate. **Journal of Experimental Zoology**

Part B: Molecular and Developmental Evolution, v. 306B, n. 5, p. 470–480, 15 set. 2006.

JEFFERY, W. R. et al. Trunk lateral cells are neural crest-like cells in the ascidian *Ciona intestinalis*: insights into the ancestry and evolution of the neural crest. **Developmental biology**, v. 324, n. 1, p. 152–160, 1 dez. 2008.

JEFFERY, W. R.; STRICKLER, A. G.; YAMAMOTO, Y. Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. **Nature**, v. 431, n. 7009, p. 696–699, 2004.

JEN, J. C. et al. Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5676, p. 1509–1513, 4 jun. 2004.

JIA, L.; CHENG, L.; RAPER, J. Slit/Robo signaling is necessary to confine early neural crest cells to the ventral migratory pathway in the trunk. **Developmental Biology**, v. 282, n. 2, p. 411–421, 2005a.

JIA, L.; CHENG, L.; RAPER, J. Slit/Robo signaling is necessary to confine early neural crest cells to the ventral migratory pathway in the trunk. **Developmental biology**, v. 282, n. 2, p. 411–421, 15 jun. 2005b.

KAGEYAMA, R.; OHTSUKA, T.; TOMITA, K. The bHLH gene *Hes1* regulates differentiation of multiple cell types. **Molecules and cells**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 29 fev. 2000.

KANEHISA, M.; GOTO S.; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res.** 28, 27-30 .2000.

KANEHISA, M., SATO, Y., FURUMICHI, M., MORISHIMA, K., TANABE, M.; New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Res.** 47, D590-D595 2019

KANEHISA, M; Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. **Protein Sci.** 28, 1947-1951 2019.

KAPUR, R. P. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in *Sox10(Dom)/Sox10(Dom)* mouse embryos. **Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society**, v. 2, n. 6, p. 559–569, 1999.

KAWASAKI-NISHIHARA, A. et al. ET3/*Ednrb2* signaling is critically involved in regulating melanophore migration in *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 6, p. 1454–1466, 2011.

KELSH, R. N.; EISEN, J. S. The zebrafish colourless gene regulates development of non-ectomesenchymal neural crest derivatives. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 3, p. 515–525, fev. 2000.

KIDD, T.; BLAND, K. S.; GOODMAN, C. S. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 785–794, 19 mar. 1999.

KOBAYASHI, T.; YASUDA, K.; ARAKI, M. Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation. **Development, growth & differentiation**, v. 52, n. 4, p. 351–363, maio 2010.

KOS, R. et al. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 8, p. 1467–1479, abr. 2001.

KRATOCHWIL, K. et al. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. **Genes & development**, v. 10, n. 11, p. 1382–1394, 1 jun. 1996.

KRULL, C. E. et al. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. **Current Biology**, v. 7, n. 8, p. 571–580, 1997.

KUKLENSKI, J. Uber das Vorkommen und die Verteilung des Pigmentes in den Organen und Geweben bei japonischen Seidenhühnen. **Z. Anat. Entwicklungsgesch.**, v. 87, p. 1–37, 1 maio 1915.

KURATANI, S. C.; KIRBY, M. L. Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. **The American journal of anatomy**, v. 191, n. 3, p. 215–227, jul. 1991.

LABBÉ, E.; LETAMENDIA, A.; ATTISANO, L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8358–8363, 18 jul. 2000.

LAHAV, R. et al. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 3892–3897, 30 abr. 1996.

LANG, D. et al. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 884–887, 2005.

LANNOY, V. J. et al. Isoforms of hepatocyte nuclear factor-6 differ in DNA-binding properties, contain a bifunctional homeodomain, and define the new ONECUT class of homeodomain proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13552–13562, 29 maio 1998.

LE DOUARIN, N. M. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637–4650, 1 out. 2004.

LECOIN, L. et al. Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3024–3029, 1998.

LEE, M. et al. Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37978–83, 1 dez. 2000.

LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends in molecular medicine**, v. 12, n. 9, p. 406–414, set. 2006.

LI, J. et al. YY1 regulates melanocyte development and function by cooperating with MITF. **PLoS genetics**, v. 8, n. 5, p. e1002688–e1002688, 2012.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, 22 fev. 2007.

LISTER, J. A. et al. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. **Development (Cambridge, England)**, v. 126, n. 17, p. 3757–3767, set. 1999.

LIU, J. et al. Congenital diaphragmatic hernia, kidney agenesis and cardiac defects associated with Slit3-deficiency in mice. **Mechanisms of development**, v. 120, n. 9, p. 1059–1070, set. 2003.

LOVE, J. J. et al. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. **Nature**, v. 376, n. 6543, p. 791–795, 1995.

MAKITA T. MOCHIZUKI S. **Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl, 1: Light microscopic observations**, 1984.

MARCHANT, L. et al. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. **Developmental Biology**, v. 198, n. 2, p. 319–329, 1998.

MAYOR, R.; GUERRERO, N.; MARTÍNEZ, C. Role of FGF and noggin in neural crest induction. **Developmental biology**, v. 189, n. 1, p. 1–12, 1 set. 1997.

MIKELS, A. J.; NUSSE, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene**, v. 25, n. 57, p. 7461–7468, 2006.

MINCHIN, J. E. N.; HUGHES, S. M. Sequential actions of Pax3 and Pax7 drive xanthophore development in zebrafish neural crest. **Developmental biology**, v. 317, n. 2, p. 508–522, 15 maio 2008.

MITCHELL, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, 2019;

MITRA, D. et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 449–453, 2012.

MONSORO-BURQ, A.-H.; FLETCHER, R. B.; HARLAND, R. M. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF

signals. **Development**, v. 130, n. 14, p. 3111 LP – 3124, 15 jul. 2003.

MONSORO-BURQ, A. H. PAX transcription factors in neural crest development. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 44, p. 87–96, ago. 2015.

MONTOJO, J. et al. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. **F1000Research**, v. 3, p. 153, 1 jul. 2014.

MORIYAMA, M. et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. **The Journal of cell biology**, v. 173, n. 3, p. 333–339, 8 maio 2006.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; ELIZABETH PATTON, E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 4, p. 620–632, 2015.

MUROYA, S. et al. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the silky fowl. **The Journal of veterinary medical science**, v. 62, n. 4, p. 391–395, abr. 2000.

NAGY, N.; GOLDSTEIN, A. M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. **Developmental biology**, v. 293, n. 1, p. 203–217, 1 maio 2006.

NATAF, V.; LE DOUARIN, N. M. Induction of melanogenesis by tetradecanoylphorbol-13 acetate and endothelin 3 in embryonic avian peripheral nerve cultures. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 3, p. 172–178, 2000.

NAWSHAD, A.; HAY, E. D. TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. **The Journal of cell biology**, v. 163, n. 6, p. 1291–1301, 22 dez. 2003.

NITZAN, E. et al. A dynamic code of dorsal neural tube genes regulates the segregation between neurogenic and melanogenic neural crest cells. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 11, p. 2269–2279, 2012.

OAKLEY, R. A. et al. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. **Development**, v. 120, n. 1, p. 103–114, 1994.

OAKLEY, R.; TOSNEY, K. Peanut Agglutinin and Chondroitin-6-Sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. **Developmental biology**, v. 147, p. 187–206, 1 out. 1991.

OPDECAMP, K. et al. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 12, p. 2377–2386, jun. 1997.

OSÓRIO, L.; TEILLET, M.-A.; CATALA, M. Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. **Development**, v. 136, n. 10, p. 1717 LP – 1726, 15 maio 2009.

OUGHTRED R, et al.. The BioGRID interaction database: 2019 update. **Nucleic**

Acids Res. Jan 8;47(D1):D529-D541 2019.

PANI, L.; HORAL, M.; LOEKEN, M. R. Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. **Genes & development**, v. 16, n. 6, p. 676–680, 15 mar. 2002.

PLA, P. et al. Ednrb2 orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 181–187, 2005.

PLA, P.; LARUE, L. Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 47, n. 5, p. 315–325, 2003.

POTTERF, S. B. et al. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. **Human genetics**, v. 107, n. 1, p. 1–6, jul. 2000.

POTTHOFF, M. J.; OLSON, E. N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 23, p. 4131–4140, dez. 2007.

QU, H. et al. Smad4 suppresses the tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma through repressing the expression of heparanase. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32628, 2016.

RAPAPPORT N., et al. MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search , **Nucleic Acids Research**. 2016

REEDY, M.; FARACO, C.; ERICKSON, C. The Delayed Entry of Thoracic Neural Crest Cells into the Dorsolateral Path Is a Consequence of the Late Emigration of Melanogenic Neural Crest Cells from the Neural Tube. **Developmental biology**, v. 200, p. 234–246, 1 set. 1998.

REISSMANN, M.; LUDWIG, A. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 24, n. 6–7, p. 576–586, 2013.

RUSSO, M. T. et al. Regulatory elements controlling Ci-msxb tissue-specific expression during *Ciona intestinalis* embryonic development. **Developmental Biology**, v. 267, n. 2, p. 517–528, 15 mar. 2004.

SABATIER, C. et al. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 157–169, 16 abr. 2004.

SANTIAGO, A.; ERICKSON, C. A. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. **Development**, v. 129, n. 15, p. 3621–3632, 2002.

SATO, A. et al. FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. **Developmental Biology**, v. 354, n. 1, p. 18–30, 2011.

SCHOUWEY, K. et al. Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 1, p. 282–289, 1 jan. 2007.

SEBERG, H. E.; VAN OTTERLOO, E.; CORNELL, R. A. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 30, n. 5, p. 454–466, 2017.

SELA-DONENFELD, D.; KALCHEIM, C. Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. **Development**, v. 126, n. 21, p. 4749–4762, 1999.

SELA-DONENFELD, D.; KALCHEIM, C. Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 22, p. 4845–4854, 2000.

SELA-DONENFELD, D.; KALCHEIM, C. Localized BMP4-noggin interactions generate the dynamic patterning of noggin expression in somites. **Developmental biology**, v. 246, n. 2, p. 311–328, 2002.

SHANNON et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. **Genome Research**, v. 13, n. 22, p. 426, 1971.

SHI, Y.; LEE, J. S.; GALVIN, K. M. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... **Biochimica et biophysica acta**, v. 1332, n. 2, p. F49–F66, 18 abr. 1997.

SHIBAHARA, S. et al. Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF): Multiplicity in Structure, Function, and Regulation. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 1, p. 99–104, 2001.

SIMOES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v. 142, n. 2, p. 242–257, 15 jan. 2015.

SIMÕES-COSTA, M.; STONE, M.; BRONNER, M. E. Axud1 Integrates Wnt Signaling and Transcriptional Inputs to Drive Neural Crest Formation. **Developmental cell**, v. 34, n. 5, p. 544–554, 14 set. 2015.

SIMON, J. D. et al. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment cell & melanoma research**, v. 22, n. 5, p. 563–579, out. 2009.

SOUTHARD-SMITH, E. M.; KOS, L.; PAVAN, W. J. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. **Nature genetics**, v. 18, n. 1, p. 60–64, jan. 1998.

STELZER, G. et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 1.30.1-

1.30.33, 1 jun. 2016.

STOCKDALE, F. E.; NIKOVITS JR, W.; CHRIST, B. Molecular and cellular biology of avian somite development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 219, n. 3, p. 304–321, nov. 2000.

STRUB, T. et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. **Oncogene**, v. 30, n. 20, p. 2319–2332, 19 maio 2011.

SZKLARCYK, D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Res.** Jan; 47:D607-613.2019

TANG, W. et al. Cardiac neural crest contributes to cardiomyocytes in amniotes and heart regeneration in zebrafish. **eLife**, v. 8, p. e47929, 8 ago. 2019.

TAO, Q. et al. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 857–71, 25 mar. 2005.

TASSABEHJI, M. et al. The mutational spectrum in Waardenburg syndrome. **Human molecular genetics**, v. 4, n. 11, p. 2131–2137, nov. 1995.

TASSY, O. et al. The ANISEED database: digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program. **Genome research**, v. 20, n. 10, p. 1459–1468, out. 2010.

TEILLET, M.-A.; KALCHEIM, C.; LE DOUARIN, N. M. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. **Developmental Biology**, v. 120, n. 2, p. 329–347, abr. 1987.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 11, p. 1849–1858, jun. 2009.

TOSNEY, K. W. Long-Distance Cue from Emerging Dermis Stimulates Neural Crest Melanoblast Migration. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 1, p. 99–108, 2004.

TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. [s.l: s.n.].

TUMELTY, K. E. et al. Identification of direct negative cross-talk between the SLIT2 and bone morphogenetic protein-Gremlin signaling pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 9, p. 3039–3055, 2 mar. 2018.

VACHTENHEIM, J.; NOVOTNA, H.; GHANEM, G. Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1505–1511, dez. 2001.

VEGA-LOPEZ, G. A.; CERRIZUELA, S.; AYBAR, M. J. Trunk neural crest cells: Formation, migration and beyond. **International Journal of Developmental Biology**, v. 61, n. 1–2, p. 5–15, 2017.

VILLANUEVA, S. et al. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. **Developmental biology**, v. 241, n. 2, p. 289–301, 15 jan. 2002.

VOGEL-HÖPKER, A. et al. Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. **Mechanisms of development**, v. 94, n. 1–2, p. 25–36, jun. 2000.

WADA, H.; MAKABE, K. Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest. **International Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 133–141, 2006.

WANG, H. U.; ANDERSON, D. J. Eph Family Transmembrane Ligands Can Mediate Repulsive Guidance of Trunk Neural Crest Migration and Motor Axon Outgrowth. **Neuron**, v. 18, n. 3, p. 383–396, 1997.

WANG, X. et al. Combined transcriptomics and proteomics forecast analysis for potential genes regulating the Columbian plumage color in chickens. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0210850, 6 nov. 2019.

WANG, Y. et al. The Long Noncoding RNA lncTCF7 Promotes Self-Renewal of Human Liver Cancer Stem Cells through Activation of Wnt Signaling. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 4, p. 413–425, 2015.

WARDE-FARLEY, D. et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_2, p. W214–W220, 21 jun. 2010.

WATANABE, A. et al. Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. **Nature genetics**, v. 18, n. 3, p. 283–286, mar. 1998.

WEBSTER, D. E. et al. Enhancer-targeted genome editing selectively blocks innate resistance to onco kinase inhibition. **Genome research**, v. 24, n. 5, p. 751–760, maio 2014.

WELSH, I. C.; O'BRIEN, T. P. Loss of Late Primitive Streak Mesoderm and Interruption of Left–Right Morphogenesis in the Ednrbs-1Acr^g Mutant Mouse. **Developmental Biology**, v. 225, n. 1, p. 151–168, 1 set. 2000.

WOLPERT, L.; TICKLE, C. **Principles of Development**. [s.l.] OUP Oxford, 2011.

XU, Y. et al. Detailed Analysis of Molecular Mechanisms in Primary and Metastatic Melanoma. **Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology**, v. 27, n. 1, p. 9–19, jan. 2020.

YAJIMA, I. et al. Cloning and functional analysis of ascidian Mitf in vivo: insights

into the origin of vertebrate pigment cells. **Mechanisms of development**, v. 120, n. 12, p. 1489–1504, dez. 2003.

YANG, R. et al. Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. **Nature communications**, v. 5, p. 5807, 16 dez. 2014.

YASUMOTO, K. et al. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. **The EMBO journal**, v. 21, n. 11, p. 2703–2714, 3 jun. 2002.

YU, S. et al. The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 813–826, 16 nov. 2012.

YUAN, J.; LIU, M. Chiral Molecular Assemblies from a Novel Achiral Amphiphilic 2-(Heptadecyl) Naphtha[2,3]imidazole through Interfacial Coordination. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 17, p. 5051–5056, 1 abr. 2003.