

Gabriel da Silva Pescador

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)
SOBRE O MECANISMO MOLECULAR QUE CONTROLA A
DIFERENCIAÇÃO DE MELANÓCITOS**

Monografia submetida ao curso de
graduação da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ricardo
Castilho Garcez

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Pescador, Gabriel da Silva

EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) SOBRE O
MECANISMO MOLECULAR QUE CONTROLA A DIFERENCIAÇÃO DE
MELANÓCITOS / Gabriel da Silva Pescador ; orientador,
Ricardo Castilho Garcez - Florianópolis, SC, 2016.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Crista neural. 3. EGF. 4.
Sox10. 5. FoxD3. I. Garcez, Ricardo Castilho. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Gabriel da Silva Pescador

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)
SOBRE O MECANISMO MOLECULAR QUE CONTROLA A
DIFERENCIAÇÃO DE MELANÓCITOS**

Esta monografia foi julgada adequada para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovada em sua forma final pelo curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de julho de 2016.

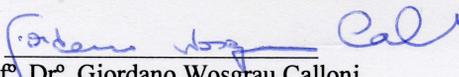
Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

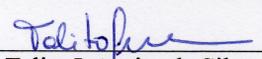

Prof.^o Dr.^o Ricardo Castillo Garcez

Orientador

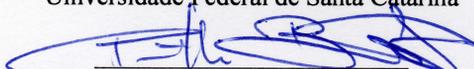
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof.^o Dr.^o Giordano Vosgrau Calloni

Universidade Federal de Santa Catarina


Dr.^a Talita Jeremias da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina


Biol.^a Priscilla Barro Delben

Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado ao meu orientador, meus amigos e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Ricardo Castilho Garcez. Por sua paciência ao ensinar, discutir e incentivar. Com suas conversas que me inspiravam em continuar tentando, mesmo quando tudo parecia dar errado. Sempre que me via desanimado indo fazer um experimento soltava sua frase “Vai na capela de fluxo laminar lá atrás, ajoelha e reza pra ter mais fé que seu experimento vai dar certo.”. Obrigado por me inspirar tanto em continuar seguindo carreira científica só por ver o jeito que você olha para a ciência.

A todas as pessoas do LACERT, tanto as que já saíram quanto as que continuam no laboratório, pela descontração no ambiente de trabalho. Principalmente a minhas colegas de bancada na biologia molecular, Jaque e Alê, por sempre ajudarem quando necessário e escrever/desenhar incentivos no nosso quadro branco de lá. Agradeço também a Pri, por estar sempre positiva e disposta a conversar sobre o laboratório e a vida.

Aos professores Giordano e Margherita, por me inspirarem a buscar a área de biologia celular quando assisti suas aulas. Também a todos os outros ótimos professores que tive o prazer de conhecer durante a graduação e que fizeram toda a diferença.

Aos meu amigos: Nícolas, Lua, Rodrigo (vulgo Carioca), Guilherme e Andressa, por dividirmos tantos momentos bons e ruins nessa faculdade. Pelas risadas nas filas do RU, bares, encontros em casa. Por sempre estarem presentes e por todas nossas discussões sobre biologia, política, religião, entre outros assuntos.

A minha família por todo o apoio que me deram, e seu interesse em entender o que eu estava fazendo. Por me aguentarem nessa etapa final da graduação e me incentivarem a continuar buscando o que eu mais gosto de fazer.

A todos que conheci durante meu intercâmbio nos Estados Unidos, na pequena cidade de Pittsburgh. Alan, Bruna e Carol, por todas as noites de filmes, conversas, problemas e momentos bons que passamos juntos. Sophia, Kelly, Danielle e Kyoko, por entenderem quando meu inglês falhava, pelas trocas culturais e me ajudarem no que as vezes eu não entendia da cultura americana. Por mais que tenhamos convivido por apenas um ano, vocês fizeram toda a diferença na minha vida.

To a person that turned to be very special to me in my last moments in the USA. Who is always cheering me up when I'm down, even though we can only talk in the mornings and evenings because of the time difference. For making me laugh so much while writing this thesis

when I asked her to help me name an embryo image, and after some seconds she just said: “You should name it Mimi!”. Thank you Haebin for bearing me at my worst moments and making everything look better with just one smile.

Por fim, agradeço as bolsas de monitoria e extensão fornecidas pela UFSC, que me ajudaram a me manter nesses anos de graduação, e a bolsa do Ciências sem Fronteiras, por proporcionar uma das melhores experiências da minha vida.

RESUMO

A pigmentação é uma característica presente em todos os animais e possui muitas funções. Apesar de existirem vários tipos de células pigmentares (cromatóforos), os melanócitos são compartilhados por todos os cordados, e tem sua origem da crista neural (CN). As células da CN se formam durante fechamento do tubo neural, nas bordas do neuroepitélio. Após sofrerem transição epitélio-mesenquimal, elas migram por rotas específicas, diferenciando em seus tecidos alvo. Os melanócitos surgem, principalmente, das células da CN que seguem a rota de migração dorso-lateral. Quando essas células estão migrando param de expressar *FoxD3*, mas mantém sua expressão de *Sox10*, para mais tarde começar a expressar *Mitf*. O EGF é uma pequena proteína que é expressa pelo embrião em desenvolvimento e que atua como um fator solúvel. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o tratamento com Egf em culturas de células da CN promove a diferenciação dessas células para melanócitos e neurônios. Para compreender melhor os mecanismos celulares associados a esse efeito, foram avaliados nesse trabalho a influência de Egf sobre a expressão de *FoxD3* e *Sox10*, considerados os principais reguladores da diferenciação para melanócitos. Segmentos truncais inteiros de embrião de codorna foram cultivados em condição controle, suplementado com Egf (10 ng/ml), suplementado com Cetuximab (50 µg/ml) um bloqueador do EgfR e suplementado com Egf e Cetuximab (10 ng/ml e 50µg/ml, respectivamente). Após esse período foi realizada hibridização *in situ* para *FoxD3* e *Sox10* e analisados os padrões de expressão mediante os tratamentos. Além disso, foram realizados experimentos com células de melanoma murino (B16/F10), afim de avaliar o efeito do Egf sobre a expressão de *Mitf*. Os resultados obtidos mostraram que o Egf reduz a expressão de *FoxD3* nas células da crista neural migratórias, e que o bloqueio do EgfR diminui drasticamente a expressão de *Sox10*. As células de melanoma murino não apresentaram diferenças entre seus tratamentos. Esses dados sugerem que o Egf atua no controle molecular do processo de diferenciação dos melanócitos. Além disso, nossos resultados demonstram que células de melanoma utilizam mecanismos moleculares diferentes daqueles do desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Crista neural. Diferenciação celular. ErbB1. Sox10. FoxD3. Erbitux.

ABSTRACT

Pigmentation is present in all animals with many functions. Despite other kinds of pigment cells (chromatophores), melanocytes are shared among all chordates and are known to arise from the neural crest (NC). These cells come from the neural tube closure, at the neural plate borders, and undergo epithelial to mesenchymal transition to migrate and undergo differentiation. Melanocytes arise mainly from the dorso-lateral migration pathway. When undergoing migration, NC cells stop expressing *FoxD3* and keep *Sox10*, and later start expressing *Mitf*. EGF is a small protein known to be expressed in the developing embryo and to act like a growth factor. Cetuximab is an antagonist of the EGF receptor (Egfr), used for some cancer treatments. Previous data from our group show that EGF treatments in culture promote differentiation of neural crest cells into neurons and melanocytes, *in vitro*. For a better understanding on the molecular mechanisms associated with this effect, we evaluated in this work the influence EGF has on *Sox10* and *FoxD3* expressions. These two transcription factors are considered the main regulators of melanocytic differentiation. Trunk neural crest explants were cultivated for 6 hours in control medium, basic medium with EGF (10ng/ml), basic medium with Cetuximab (50 µg/ml), an Egfr blocker and with EGF and Cetuximab together (10 ng/ml and 50µg/ml). Analyses of explants were made by *in situ* hybridization for *FoxD3* and *Sox10*. In addition to that, mouse melanoma cells were assessed for the influence of EGF in *Mitf* expression. Those cells were cultivated for 24 hours in control medium, basic medium with EGF (10ng/ml and 100ng/ml), basic medium with Cetuximab (50 µg/ml) and basic medium with EGF and Cetuximab together (10 ng/ml, 100 ng/ml and 50 µg/ml). The results from this work show that EGF-treated explants have reduced *FoxD3* expression. Also, the absence of EGF with Cetuximab treatments reduced drastically the expression of *Sox10* in explants. Analysis of mouse melanoma cells did not show any significant difference between treatments. All this data together indicated that EGF plays a major role in the molecular mechanism of melanocyte differentiation, and that mouse melanoma cells probably adopt different mechanisms from those used for melanocyte specification in embryonic development.

Keywords: Neural crest. Erbitux. ErbB1. cellular differentiation. Sox10. FoxD3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de neurulação e formação da crista neural.....	20
Figura 2 – Esquema de formação, migração e expressão gênica das células da crista neural truncal.....	22
Figura 3 – Mapa dos domínios e fenótipos originados pelas células da crista neural.....	23
Figura 4 – Esquema dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação melanocítica.....	26
Figura 5 – Expressão de EgfR pelas células da crista neural migratórias.....	28
Figura 6 – Plano de corte anatômico dos segmentos truncais de embrião.....	34
Figura 7 – Efeito do Egf e Cetuximab sobre a expressão de <i>FoxD3</i>	40
Figura 8 – Efeito do Egf e Cetuximab sobre a expressão de <i>Sox10</i>	41
Figura 9 – Gráficos da porcentagem de células B16/F10 marcadas com Mitf e BrdU.....	43
Figura 10 – Esquema das duas primeiras hipóteses do papel do Egf no mecanismo molecular de diferenciação dos melanócitos.....	48
Figura 11 – Esquema da terceira hipótese do papel do Egf no mecanismo molecular de diferenciação dos melanócitos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
BMP	Do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética de Osso)
BrdU	5-bromo2'-deoxiuridina
CN	Crista neural
CNC	Crista neural cefálica
CNT	Crista neural truncal
CO₂	Gás carbônico
CTL	Controle
D-MEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
Dct/TRP2	Do inglês <i>Dopachrome tautomerase</i>
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic</i>
EE	Extrato de embrião
EGFR	Receptor de EGF
Egr2	Do inglês <i>early growth response 2</i>
Erb	Do inglês <i>erythroblastic leukemia viral oncogene</i>
FGF	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
FoxD3	Do inglês <i>Forkhead box D3</i>
HCl	Ácido clorídrico
MABT	Tampão de ácido maleico adicionado de Tween 20
Mash	Conhecido como Ascl1 (do inglês <i>Achaete-scute complex homolog 1</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mitf	Do inglês <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitro-blue-tetrazólio
Pax3	Do inglês <i>Paired box 3</i>
PBS	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> (Salina de fosfato tamponada)
PBT	PBS com Tween 20

SFB	Sofor fetal bovino
Snail	Do inglês <i>Zinc-finger protein SNAI1</i>
Sox10	Do inglês <i>Sry-related HMG box 10</i>
Sox9	Do inglês <i>Sry-related HMG box 9</i>
Tyr1/2	Do inglês <i>Tyrosine1/2</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WNT	Do inglês <i>Wingless-int proteins</i>
Zic1	Do inglês <i>Zinc finger of the cerebellum 1</i>
α-MEM	Do inglês <i>α-modified minimum essential medium</i>

* 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	19
1.1 O SISTEMA PIGMENTAR	19
1.2 A CRISTA NEURAL.....	19
1.2.1 Indução da crista neural.....	21
1.2.1 Potencialidades da crista neural	22
1.2.3 Fatores que controlam a migração e a diferenciação da crista neural.....	24
1.3 O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (Egf).....	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNAS	33
4.2 CULTURA DE SEGMENTOS DA CNT	33
4.3 ANÁLISES DE EXPRESSÃO	35
4.4 CÉLULAS B16/F10 DE MELANOMA MURINO	36
4.4.1 Cultura de células.....	36
4.4.2 Imunocitoquímica.....	36
4.4.3 Análises estatísticas.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Egf DIMINUI A EXPRESSÃO DE <i>FoxD3</i>.....	39
5.2 O BLOQUEIO DO EgFR DIMINUI A EXPRESSÃO DE <i>Sox10</i> NA CN.....	40
5.3 Egf NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16/F10) MITF⁺	42
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	51
8. PERSPECTIVAS.....	53
9. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA PIGMENTAR

A pigmentação é uma característica comum na maioria dos organismos vivos. Bactérias produzem substâncias com pigmentos, protistas dinoflagelados possuem clorofila, diversos fungos com suas mais variadas cores também, bem como plantas e animais. Entre os diversos grupos, os pigmentos podem ter muitas funções, fotossíntese em plantas e alguns protozoários, por exemplo. Talvez o grupo que mais sejam notadas as pigmentações e seus padrões é o dos animais.

Os animais apresentam-se em diversas cores, como podemos perceber nos padrões coloridos em borboletas e as plumagens exuberantes de diversos pássaros. Nos cordados, a pigmentação está presente não só no tegumento, mas também no sistema visual e ao redor de algumas vísceras (KARDONG, 2012; TRAINOR, 2014). Sua função mais famosa é a de proteção contra radiação ultravioleta, mas vários pigmentos auxiliam a função do sistema visual (STRAUSS, 2005). Os pigmentos associados à pele dos cordados servem ainda como camuflagem e podem estar relacionados a comportamentos sociais bastante complexos (KARDONG, 2012; TRAINOR, 2014).

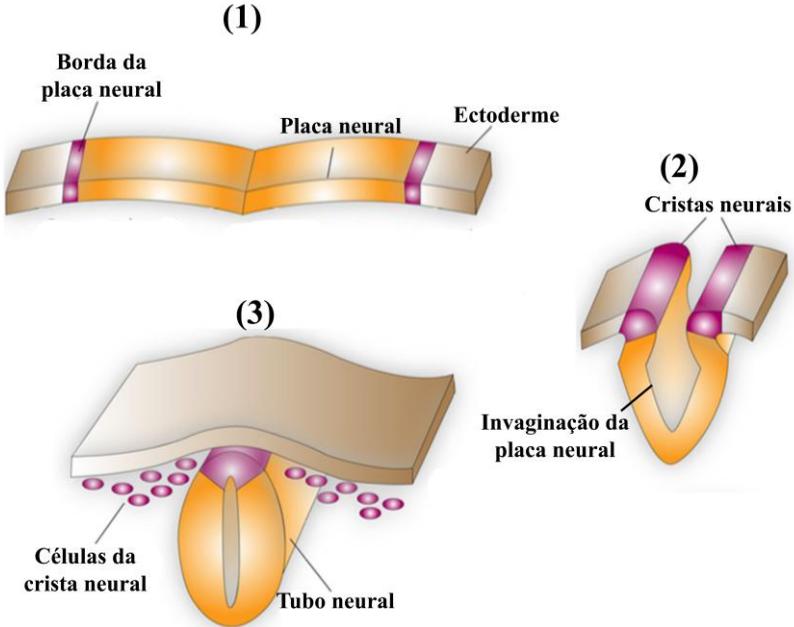
Os pigmentos são produzidos e armazenados em células especializadas dos cordados, os cromatóforos. Existem diversos tipos de cromatóforos, produzindo diferentes tipos de cores, como xantóforos (cor amarelo-vermelho-laranja), iridóforos (cor azul-prata), leucóforos (branco-refletivo) e melanócitos (preto-marrom, ou amarelo). Podemos destacar dessa lista os melanócitos, que, diferentemente dos outros, estão presentes de peixes até mamíferos. Essas células produzem melanina, uma molécula derivada do aminoácido tirosina que garante uma coloração entre marrom e preto. Assim como os outros cromatóforos, os melanócitos formam-se, ao longo do desenvolvimento embrionário, a partir das células da crista neural (TRAINOR, 2014).

1.2 A CRISTA NEURAL

A crista neural (CN) é uma população de células que se forma nas bordas dorsais do tubo neural de craniatas durante a fase de neurulação, exclusivamente durante o desenvolvimento embrionário (Figura 1) (GILBERT, 2013; TRAINOR, 2014). Algumas vezes chamada de quarto folheto embrionário (HALL, 2009), é considerada uma sinapomorfia do grupo Craniata, pois permitiu o surgimento da

mandíbula, maxila e outros tecidos craniais (GANS; NORTH CUTT, 1983).

Figura 1 – Esquema do processo de neurulação e formação da crista neural.



Fonte: Adaptado de ROSS & ZARBALIS, 2014.

Nota: (1) O processo de neurulação se inicia quando a ectoderme se diferencia em ectoderme não-neural (em marrom) e ectoderme neural (em laranja). Entre esses dois tipos de ectoderme surge uma faixa de células chamada borda da placa neural (em roxo). (2) A ectoderme neural invagina, aproximando as bordas das placas neurais, que agora é denominada crista neural. (3) A ectoderme neural se fecha formando o tubo neural, e as células da crista neural sofrem transição epitélio-mesenquimal. Essas células se desprendem do dorso do tubo neural e começam sua migração até chegarem ao seu destino final.

Essas células foram primeiramente descritas em 1868 pelo embriologista suíço Wilhelm His, que identificou uma banda de células comprimidas entre a ectoderme e o tubo neural. His nomeou essa banda de *Zwischenstrang*, que significa cordão intermediário, e só em 1879 o termo crista neural foi utilizado por Arthur Milnes Marshall para

descrever essas células (HALL, 2008). Hoje em dia, já se sabe que essa estrutura embrionária dá origem a diversos tipos celulares, em vários órgãos por todo o corpo. As células da CN, inicialmente parte do neurepitélio, são induzidas a fazer transição epitélio-mesenquimal e migram por rotas específicas ao longo de todo o embrião. São as células da CN que dão origem a boa parte da estrutura mesenquimal da cabeça (ossos da face, cartilagem, tecido conjuntivo) (PLATT, 1893), além de neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, células da glândula adrenal e melanócitos (GILBERT, 2013; LE DOUARIN *et al.*, 2004; TRAINOR, 2014).

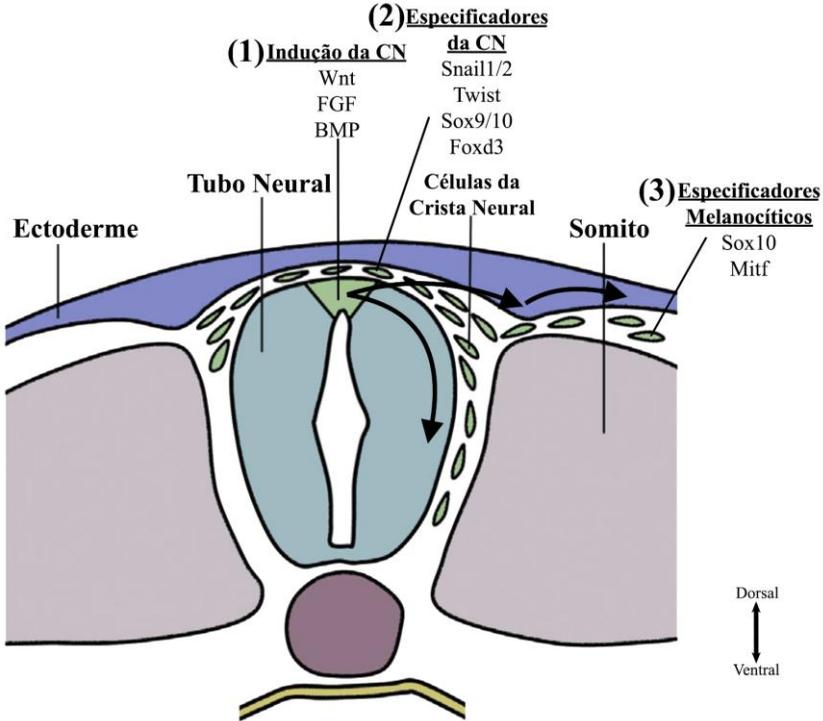
1.2.1 Indução da crista neural

A crista neural é um tecido embrionário originado durante a neurulação. Essa etapa consiste no fechamento do tubo neural e marca o início da formação do sistema nervoso. Embora ambos, o tubo neural e a CN se originem da ectoderme, a diferença no conjunto de fatores indutores especifica cada um dos tecidos (GILBERT, 2013).

As células da CN são induzidas por uma complexa conversa molecular entre um conjunto de fatores de transcrição e sinalizadores produzidos pela placa neural, ectoderme e tecidos adjacentes (Figura 2). Entre as proteínas sinalizadoras, podemos destacar as Wnts (proteínas Wingless-Int), BMPs (Proteínas Morfogenéticas de Osso) e seus antagonistas, e FGFs (Fatores de Crescimento de Fibroblasto) (GILBERT, 2013; MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004; TRAINOR, 2014). Esses fatores atuam de forma conjunta, especificando tanto a CN, quanto outros tecidos oriundos do processo de neurulação, por meio de gradientes de concentração (GILBERT, 2013; MARCHANT *et al.*, 1998). Altos níveis de BMP, por exemplo, induzem a formação da epiderme não-neural, enquanto que baixos níveis de BMP, graças a inibição por Noggin, induzem células neurais. Já níveis moderados de BMP e Wnt levam a indução de células da CN (GILBERT, 2013; MARCHANT *et al.*, 1998).

Após sofrerem indução, essas células passam a expressar genes especificadores da CN, que irão caracterizar essas células como células da CN. A expressão desses especificadores irá preparar a CN para migração, estimulando a transição epitélio-mesenquimal. Podemos destacar os genes *FoxD3*, *Snail1* e 2, *Sox9* e *Sox10* (Figura 2) que vão promover a delaminação dessas células neuroepiteliais e permitir a migração (GILBERT, 2013; NIETO *et al.*, 1994; TENG *et al.*, 2008).

Figura 2 - Esquema de formação, migração e expressão gênica das células da crista neural truncal.



Fonte: Adaptado de TRAINOR, 2014.

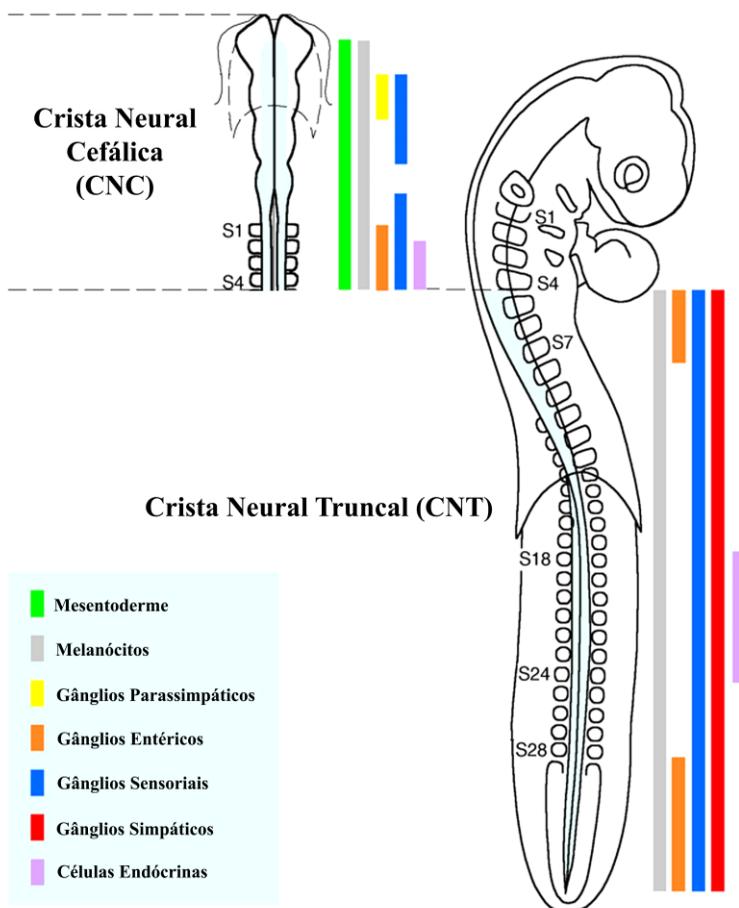
Nota: As setas representam as rotas de migração das células, sendo a dorso-ventral passando entre os somitos e o tubo neural, e a dorso-lateral passando entre os somitos e a ectoderme. (1) Na borda dorsal do tubo neural serão induzidas as células da CN por sinalização de Wnt, FGF e BMP vinda dos tecidos adjacentes. (2) Essas células se desprendem do neuroepitélio por transição epitélio-mesenquimal e migram por suas rotas específicas, agora expressando os especificadores da CN *Snail1/2*, *Twist*, *Sox9/10* e *FoxD3*. (3) As células progenitoras de melanócitos migram pela rota dorso-lateral, e quando chegam nos seus devidos nichos passam a expressar especificadores melanocíticos *Sox10* e *Mitf*.

1.2.1 Potencialidades da crista neural

Como muitas outras células embrionárias, as células da CN precisam migrar para formar seus múltiplos derivados. Pelo eixo ântero-posterior podemos caracterizar dois grandes domínios de migração da

CN, o domínio da crista neural cefálica (CNC) e o da crista neural truncal (CNT) (Figura 3). Cada domínio terá suas particularidades, seja em relação ao sentido de rotas migratórias, ou nos diferentes tipos celulares que serão capazes de originar (GILBERT, 2013; LE DOUARIN *et al.*, 2004).

Figura 3 – Mapa dos domínios e fenótipos originados pelas células da crista neural.



Fonte: Adaptado de LE DOUARIN *et al.*, 2004.

Nota: A figura representa os dois grandes domínios da CN e os tipos celulares originados de cada domínio. À esquerda em cima estão representados os

derivados da CNC, e à direita os derivados da CNT. Podemos observar que derivados mesenquimais da CN (mesectoderme) estão presentes apenas na CNC, enquanto que os melanócitos são originados de ambos os domínios.

O domínio da CNC irá contribuir para a formação da cabeça e de alguns gânglios cervicais (como o trigêmeo). As células da CNC têm a potencialidade de formar melanócitos, células gliais e neurônios (igualmente às células da CN do domínio truncal), mas também conseguem formar osso, cartilagem e tecido conjuntivo da face. As rotas migratórias das células da CNC seguem pelos rombômeros e pelo mesencéfalo, levando às células da CN a povoarem toda a parte frontal da cabeça (GILBERT, 2013; LE DOUARIN *et al.*, 2004)

Já o domínio da CNT vai contribuir para a formação de estruturas no tronco, incluindo os gânglios de raiz dorsal, algumas células da glândula adrenal, e os melanócitos (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988, 1989). Nesse domínio, as células da CN têm uma potencialidade mais restrita, formando apenas neurônios, células gliais e melanócitos. A CN nesse domínio utiliza duas rotas classicamente descritas para migração, uma rota ventro-lateral, que passa pela parte anterior dos somitos, e uma dorso-lateral, que passa entre a ectoderme e os somitos (Figura 2) (GILBERT, 2013). As células que migram pela rota ventro-lateral darão origem ao sistema nervoso periférico e a glândula adrenal, enquanto que as que migram pela rota dorso-lateral darão origem aos melanócitos da pele (BRONNER-FRASER, 1986; GILBERT, 2013; TRAINOR, 2014). Alguns autores especificam uma terceira rota de migração dorso-ventral, onde as células da CN migram ventralmente sem entrar pelos somitos e formam os gânglios simpáticos e as células da glândula adrenal (BRONNER-FRASER, 1986; TRAINOR, 2014).

Essas duas rotas de migração acontecem em tempos distintos, sendo a ventro-lateral ocorrendo primeiro que a dorso-lateral. Esse pequeno intervalo de tempo a mais que as células do caminho dorso-lateral levam para sair do tubo neural, parece ser um fator importante para a diferenciação da CN em melanócitos (SOMMER, 2011; WESTON, 1991).

1.2.3 Fatores que controlam a migração e a diferenciação da crista neural

O destino das células da CN é controlado por conversas moleculares que envolvem fatores solúveis (sinalizadores) e fatores de transcrição. Enquanto que os fatores solúveis são secretados por tecidos adjacentes, e

pelas próprias células da CN, os fatores de transcrição são produzidos no citoplasma, e agem no núcleo da célula. Os fatores solúveis e a matriz extracelular formam microambientes que definem as rotas de migração das células da CN, bem como induzem a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela migração e diferenciação dessas células (CHEUNG *et al.*, 2005; GILBERT, 2013; HALL, 2009). Devemos lembrar que há um balanço preciso de todos esses fatores em conjunto, e o microambiente encontrado pelas células, durante sua migração irá fazer o controle fino do processo de diferenciação (BRONNER-FRASER, 1986; LE DOUARIN *et al.*, 2004; TRAINOR, 2014).

Dentre os fatores solúveis podemos destacar os membros da família Fgf, que são conhecidos por estimularem a proliferação de células da CN *in vitro* (MURPHY *et al.*, 1994). Outro exemplo é a família das endotelinas, que é conhecida por estimular migração de melanoblastos e precursores neuronais (LEE; LEVORSE; SHIN, 2003; SOMMER, 2011). Já a sinalização Wnt/ β -catenina estimula o fenótipo melanocítico (SOMMER, 2011), mas apenas quando ativo nas células da CN já migratórias (HARI *et al.*, 2012). Essa via de sinalização Wnt também parece estar associada ao fator de crescimento epidermal (Egf), utilizando-se da sinalização do receptor para Egf (Egfr) para translocar β -catenina para o núcleo (TAN *et al.*, 2005). Dados do nosso grupo também demonstraram que o Fgf2 estimula a diferenciação das células da CNT para o fenótipo glial, *in vitro* (GARCEZ *et al.*, 2009).

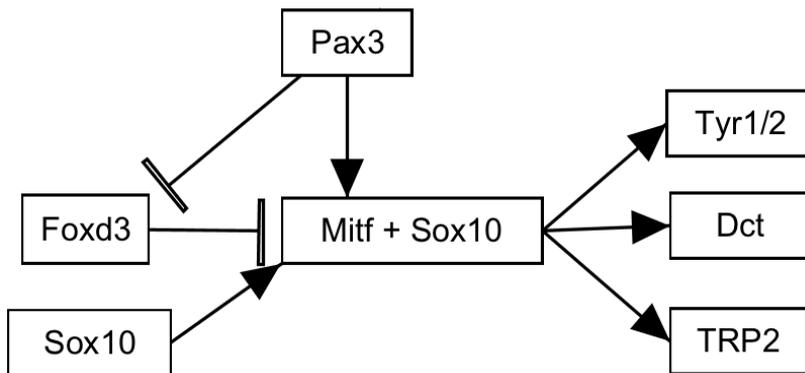
Os microambientes definidos pelos fatores solúveis vão induzir a expressão de fatores de transcrição “especificadores da crista neural”, que provocam alterações nos mecanismos de adesão e na arquitetura celular necessárias para que haja transição epitélio-mesenquimal das células da CN. A expressão de *FoxD3*, por exemplo, está associada a perda de expressão de N-caderinas, uma molécula responsável por uma forte adesão das células da CN ao neuroepitélio (AKITAYA; BRONNER-FRASER, 1992; CHEUNG *et al.*, 2005). Outro exemplo é a expressão de *Snail*, que está associado a repressão de E-caderinas, uma molécula que impede a delaminação epitelial. *FoxD3* também está relacionado ao aumento de expressão de caderina-7, necessária para migração da CN. (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004).

A expressão dos fatores de transcrição pelas células, em conjunto com o microambiente encontrado por elas, leva à expressão de genes efetores, que permitirão a diferenciação final das células da CN (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004). Dentre os genes efetores podemos destacar o *Sox10*, necessário para a gliogênese, neurogênese e diferenciação para melanócitos pelas células da CN. A

diferenciação das células da CN por *Sox10* é feita por meio de ativação de genes especificadores dos fenótipos citados, como *Egr2*, *Mash* e *Mitf*, respectivamente (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004).

Além de *Sox10*, as células da CN que seguirão o caminho da diferenciação para melanócitos precisam diminuir sua expressão de *FoxD3*, pois esse gene é um repressor do fator de transcrição associado a microftalmia (*Mitf*). Esse fator é considerado um marco para a especificação melanocítica, e mutações no gene associado a esse fator causam defeitos de pigmentação em diversas espécies, incluindo humanos. Os progenitores melanocíticos da CN começam a expressar *Mitf* logo após o início de sua migração, e essa expressão é sustentada por *Sox10*, que liga-se diretamente ao promotor de *Mitf* (SOMMER, 2011). Curiosamente, assim que as células que migram pela rota dorso-lateral se desprendem do neuroepitélio começam a reprimir a expressão de *FoxD3*, provavelmente por começarem a expressar *Pax3* (Figura 4). Isso possibilita que o programa molecular de diferenciação dos melanócitos seja desencadeado com o início de expressão de *Mitf* (SOMMER, 2011).

Figura 4 – Esquema dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação melanocítica.



Fonte: Produzida pelo autor (2016).

Nota: *FoxD3* e *Sox10* são genes especificadores da crista neural expressos logo após a indução da CN. Quando as células da CN se desprendem do neuroepitélio e iniciam sua migração pela rota dorso-lateral elas diminuem sua expressão de *FoxD3*, repleto pela expressão de *Pax3*, e continuam a expressar *Sox10* e *Mitf*. A expressão de ambos esses genes é necessária para ativar genes especificadores de melanócitos, como *Tyr1/2*, *Dct* e *TRP2*, que vão dar continuidade a diferenciação para melanócitos.

Dados prévios do nosso grupo mostraram que o Egf estimula a diferenciação das células da CN para fenótipo melanocítico *in vitro* (GARCEZ *et al.*, 2009). Além disso, dados não publicados do nosso grupo mostram que células da CN tratadas com Egf, *in vitro*, diminuem a expressão de *FoxD3*. Esses dados sugerem que o Egf possa participar no mecanismo molecular de controle da diferenciação dos melanócitos, regulando as expressões dos genes efetores para melanócitos.

1.3 O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (Egf)

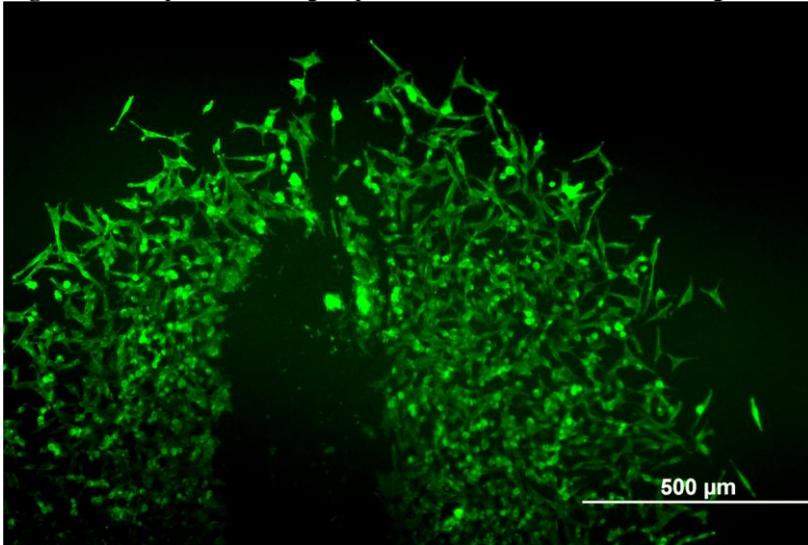
O fator de crescimento epidermal (Egf) é uma proteína de 53 aminoácidos, que foi descoberta e nomeada por estimular a proliferação e diferenciação de tecidos epiteliais, quando injetado em camundongos recém-nascidos (ABBOTT; PRATT, 1988). O Egf interage com a família de receptores tirosinoquinases chamados Erb, sendo o ErbB1 o de maior importância (MCINNES; SYKES, 1997). Esse receptor foi inicialmente chamado de EGFR, nomenclatura que prevalece até hoje. Uma vez ativado, tem suas funções relacionadas à proliferação, sobrevivência e modulação da expressão gênica. Além dessa função, é notado que a interação de Egf ao EgfR estimula a locomoção de células epiteliais e fibroblastos (BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009). Dentro da família de receptores Erb podemos destacar também ErbB3 e ErbB4, receptores de neuregulinas, e ErbB2, um amplificador de sinal de todos os receptores dessa família. As neuregulinas são proteínas da família dos Egfs, e possuem uma parte de sua estrutura *Egf-like* (MCINNES; SYKES, 1997).

O EgfR é um receptor superexpresso em alguns tipos de tumores, como adenocarcinoma mamário (ALORABI; SHONKA; GANTI, 2016). Essas células tumorais utilizam dessa sinalização para aumentar sua proliferação e sobrevivência (KIRKPATRICK; GRAHAM; MUHSIN, 2004). O tratamento, nestes casos, acontece pelo bloqueio do EgfR por meio de fármacos, como o Cetuximab. O Cetuximab é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino que compete com o Egf pela ligação ao domínio extracelular do EgfR. Ele é produzido e comercializado pela Roche com o nome de Erbitux[®], e atualmente tem sido utilizado para tratamento de certos cânceres. É considerado uma terapia alvo-específica pois liga-se especificamente ao EgfR. A ligação do Cetuximab ao EgfR impede o Egf de se ligar a este receptor, funcionando como um antagonista da sinalização Egf. Muitos tumores apresentam a expressão de fatores de resistência a quimioterápicos

dependentes da sinalização Egf, via EgfR (PAK, 2015), e elucidar seus mecanismos moleculares associados poderia abrir novas possibilidades de tratamento. Em pesquisa, o Cetuximab pode ser amplamente utilizado em sistemas *in vivo*, pois já apresenta formulação/veículo que permite administração clínica.

Dados do nosso grupo demonstraram que células da CN expressam EgfR durante a fase inicial de migração, *in vitro* (Figura 5) (TEIXEIRA, 2011). Além disso, tratamentos *in vitro* de células da CN com Egf resultaram na diminuição da expressão de *FoxD3*, além de aumentar o número de células *Mitf* positivas nas culturas (dados não publicados). Esse conjunto de dados sugere que a sinalização Egf é capaz estimular a diferenciação de melanócitos, *in vitro*. No entanto, não existem dados que demonstrem a influência da sinalização Egf no desenvolvimento dos melanócitos *in vivo*.

Figura 5 – Expressão de EgfR pelas células da crista neural migratórias.



Fonte: Autorizado uso pela autora TEIXEIRA, 2011.

Nota: Placa de cultura com células da CN em fase migratória marcadas com imunofluorescência para EgfR ativado. Nesse procedimento de cultura o tubo neural de embriões de codorna foi dissecado e colocado em placa de cultura, possibilitando a migração das células da CN. Após algumas horas o tubo neural foi retirado (espaço vazio no meio) e as células da CN foram submetidas a imunofluorescência.

2. JUSTIFICATIVA

Anualmente milhares de pessoas são afetadas por doenças relacionadas aos melanócitos, tais como, distúrbios pigmentares, vitiligo e melanoma. De todos os tumores malignos registrados no Brasil, a maior parte são melanomas (30%) (BRASIL, 2016). Apesar dos muitos estudos nessa área, essas doenças não apresentam um bom prognóstico. Essa dificuldade em tratar doenças relacionadas aos melanócitos, em boa parte, se deve ao fato de conhecermos pouco sobre os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação e homeostase dos melanócitos.

Dados preliminares do laboratório mostram que o Egf foi capaz de estimular a diferenciação de melanócitos, *in vitro*. Esse efeito ocorre sobre os progenitores mais indiferenciados da crista neural (dados não publicados). Nesse projeto, utilizaremos um sistema de cultivo embrionário *ex vivo*, afim de mimetizar as condições de desenvolvimento embrionário normal para, dessa forma, verificar se o Egf teria um papel pró-melanogênico *in vivo*. Além disso, esse sistema de cultivo *ex vivo* permitirá analisarmos os principais fatores de transcrição associados ao efeito do Egf sobre a diferenciação dos melanócitos. Esses dados contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados à diferenciação dos melanócitos e, possivelmente, aos mecanismos moleculares envolvidos em doenças que envolvem alterações nos melanócitos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência, *ex vivo*, do Fator de Crescimento Epidermal (Egf) sobre a diferenciação de melanócitos derivados da crista neural truncal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos do tratamento com Egf utilizando sistema de cultivo do segmento truncal de embriões de cordona *ex vivo*, sobre a expressão dos fatores de transcrição que controlam as fases iniciais da diferenciação dos melanócitos, tais como *FoxD3* e *Sox10*, por ISH.
- Avaliar se o bloqueio do EgfR alteraria a expressão de fatores de transcrição associados ao controle da diferenciação de melanócitos.
- Verificar se o efeito do Egf sobre a expressão do fator de transcrição efetor da diferenciação melanocítica, *Mitf*, é o mesmo em um modelo experimental de células de melanoma de camundongo, linhagem B16/F10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

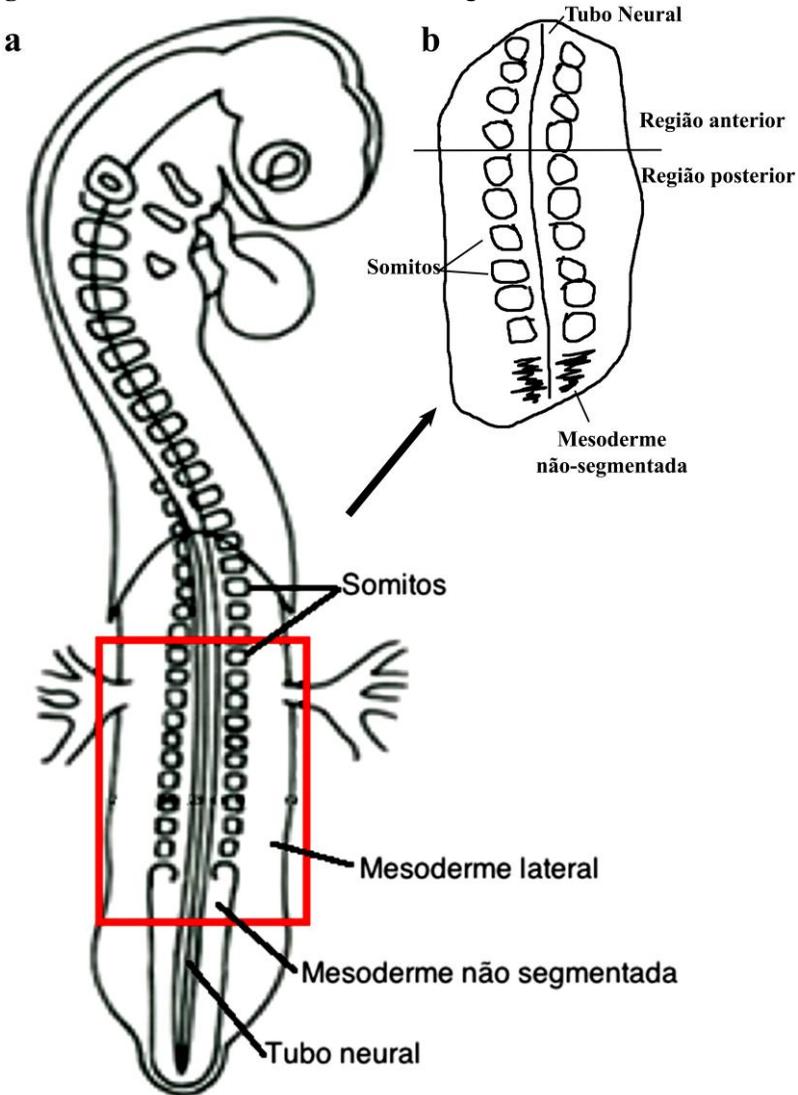
4.1 OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNAS

Ovos de codorna (*Coturnix japonica*) foram adquiridos da Granja Dumuty (localizada na cidade de Rio do Sul, Santa Catarina) e incubados em posição fixa, com a parte apical voltada para baixo, durante aproximadamente 48 horas em estufa a 38 °C em 65% de umidade relativa. As técnicas utilizadas nesse trabalho de conclusão de curso foram aprovadas pelo Comitê de Ética com o Uso de Animais – CEUA da UFSC, sob o protocolo pp00787.

4.2 CULTURA DE SEGMENTOS DA CNT

Foram utilizados embriões de codorna nos estágios 14 HH (HAMBURGUER & HAMILTON, 1992) (20-22 pares de somitos). A região trunca posterior do embrião, compreendendo a região dos 10 últimos somitos formados mais região da mesoderme não segmentada, nó e linha primitiva, foi dissecada. O limite lateral foi o final da mesoderme lateral, para melhor referência ver Figura 6. Em seguida, os fragmentos truncais dos embriões foram retirados e aderidos em membranas de nitrocelulose cortadas em retângulos (três a quatro segmentos truncais por retângulo), com o auxílio de pinças e sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). O conjunto de segmento trunca embrionário + nitrocelulose foi colocado em placa de cultura de 24 poços (1 por poço) (Corning, NY, USA), com 400 µl de meio α -modified minimum essential medium (α -MEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY), adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (10 µg/ml) (meio básico – grupo controle). Cada cultura resultou em 4 retângulos com 3-4 segmentos truncais de embrião cada, sendo um com meio básico (grupo controle), um com Egf na concentração de 10 ng/ml (grupo tratado 1), um com Egf + Cetuximab na concentração de 10 ng/ml e 50 µg/ml, respectivamente, (grupo tratado 2) e um apenas com Cetuximab na concentração de 50 µg/ml (grupo tratado 3).

Figura 6 - Plano de corte anatômico dos segmentos truncais de embrião.



Fonte: Adaptado de LE DOUARIN.

Nota: (a) Desenho de embrião de codorna, o retângulo vermelho delimita a região de corte. (b) Esquema do segmento truncais que foi analisado com mais detalhe. A região anterior é delimitada por quatro somitos e caracteriza as células da CN que estão migrando mais tardiamente (rota dorso-lateral), já a região posterior é definida pelos seis somitos mais recentemente formados e

caracteriza as células da CN que estão migrando primeiro (rota dorso-ventral). A região dos últimos dois somitos junto com a mesoderme não-segmentada caracteriza as células da CN que ainda estão aderidas ao tubo neural. Os embriões possuem uma grande variação de tamanho, portanto os segmentos truncais podem variar de tamanho mesmo estando dentro dos limites de corte estabelecidos.

Todos os grupos (CTL, Egf, Egf+Cetuximab) estavam na mesma placa de cultura e foram incubados a 37 °C em ar atmosférico enriquecido com 5% de CO₂ a 95% de umidade relativa, durante 6 horas, para análises de *FoxD3* e *Sox10*. O tempo de 6 horas foi escolhido por ser o tempo mínimo necessário para se notar diferenças nos padrões de expressão dos genes a serem analisados. Após esse período os segmentos truncais foram fixados com formaldeído a 4% (24 horas, a 4 °C) e armazenados em solução de formaldeído a 0,4% a 4 °C, para serem submetidos às análises.

4.3 ANÁLISES DE EXPRESSÃO

Foram analisados os fatores de transcrição iniciais, *FoxD3* e *Sox10*, da diferenciação dos melanócitos após tratamento com Egf e Cetuximab por meio de ISH. Os segmentos truncais fixados foram desidratados por sequência alcoólica com metanol, e após reidratados com PBS Tween 20 (PBT) 0,1% para serem tratados com proteinase K a 10 µg/ml por 20 minutos. Depois, os segmentos truncais foram pós-fixados em solução de PBT 0,1% contendo formaldeído 4% e glutaraldeído a 0,1%. Lavagens com PBT 0,1% foram feitas por 2 horas e foi trocada a solução para mix de hibridização (Formamida 50%, SSC 20x pH 5, EDTA 5 mM pH8, Yeast RNA 50 µg/ml, PBS Tween 20 0,4%, Chaps 0,5%, Heparina 100 µg/ml) ao longo das mesmas. Os segmentos truncais foram incubados de um dia para o outro a 70 °C com as sondas de RNA, marcadas com Digoxigenina, específicas de cada proteína a ser analisada. Após a incubação com a sonda, foram feitas lavagens por 3 horas, trocando-se a solução para solução tampão de ácido maléico (NaCl 150mM, NaOH 200mM e ácido maleico 100mM) contendo 0,01% de Tween 20 (MABT) ao longo das lavagens. Para detecção da sonda hibridizada foi incubado com anticorpo anti-digoxigenina *overnight*, na concentração de 1:1000 a 4 °C. Após cinco lavagens de trinta minutos em MABT, a revelação foi realizada com solução de nitro-blue-tetrazólio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) diluídos em tampão NTM pH 9,5 (Tris 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂

50mM, Tween 20 0,001%). As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio estereoscópico acoplado a sistema de captura de imagem (Olympus MVX10).

Os esquemas para melhor visualização das fotos de hibridização *in situ* foram construídos no programa Photoshop CS2. Para tal foi criada uma camada invisível por cima das fotos dos segmentos truncais e manualmente delimitados o segmento e o padrão de expressão em cores diferentes.

4.4 CÉLULAS B16/F10 DE MELANOMA MURINO

4.4.1 Cultura de células

As células de melanoma de camundongo (linhagem B16/F10) foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning, NY, USA), com 500 µl de meio Dulbecco's Modified Eagle medium (D-MEM,) acrescido de 10% SBF (Cultilab), penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (10 µg/ml) (meio controle) em cada poço. Em cada placa foram utilizados 6 poços, com 5.000 células por poço, sendo um deles com meio controle, um com meio controle adicionado de Egf 10 ng/ml (grupo tratado 1), um com meio controle adicionado de Egf 100 ng/ml (grupo tratado 2), e os outros três com as mesmas condições descritas anteriormente, mas adicionados de Cetuximab 50 µg/ml em cada uma (a concentração de Cetuximab foi estabelecida seguindo uma relação molar com o tratamento de Egf de maior concentração). Essas placas foram incubadas a 37 °C em ar atmosférico enriquecido com 5% de CO₂ a 95% de umidade relativa, durante 24 horas, sendo adicionado nas últimas duas horas de incubação Bromodeoxyuridina (BrdU) na concentração de 30 µg/ml, equivalente a 1:100, conforme orientações do fabricante. Após, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas em formaldeído 4% diluído em PBS 1x por, 30 minutos, e então estocadas em formaldeído 0,4% em PBS 1x, a 4 °C para análises posteriores.

4.4.2 Imunocitoquímica

As células que foram fixadas anteriormente nas placas foram lavadas com PBS 1x e logo incubadas por 30 minutos com PBSTT 0,5% a temperatura ambiente. Após, foram lavadas duas vezes com solução de ácido clorídrico (HCl) 2N por 15 minutos e incubadas em tampão borato pH 8,4 (ácido bórico 0,618% e NaOH 0,599%) por 15 minutos. Depois, as células foram lavadas com PBT 0,05%, incubadas com solução de

bloqueio (PBT 0,05% com SBF 5%) por 30 minutos e adicionados anti-BrdU (1:500) e anti-Mitf (1:500) e deixado *overnight* a 4 °C. Após incubação com os anticorpos, foram feitas lavagens com PBT 0,05% por 15 minutos e adicionados os anticorpos secundários respectivos por 1 hora a temperatura ambiente. Foram, então, lavados com PBT 0,05% por 15 minutos e incubados por 1 minutos com o corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindoldihidroclorido (DAPI) (Sigma Aldrich- 0,1 µg/ml). Foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico de fluorescência (Olympus IX71 com câmera Olympus DP71).

4.4.3 Análises estatísticas

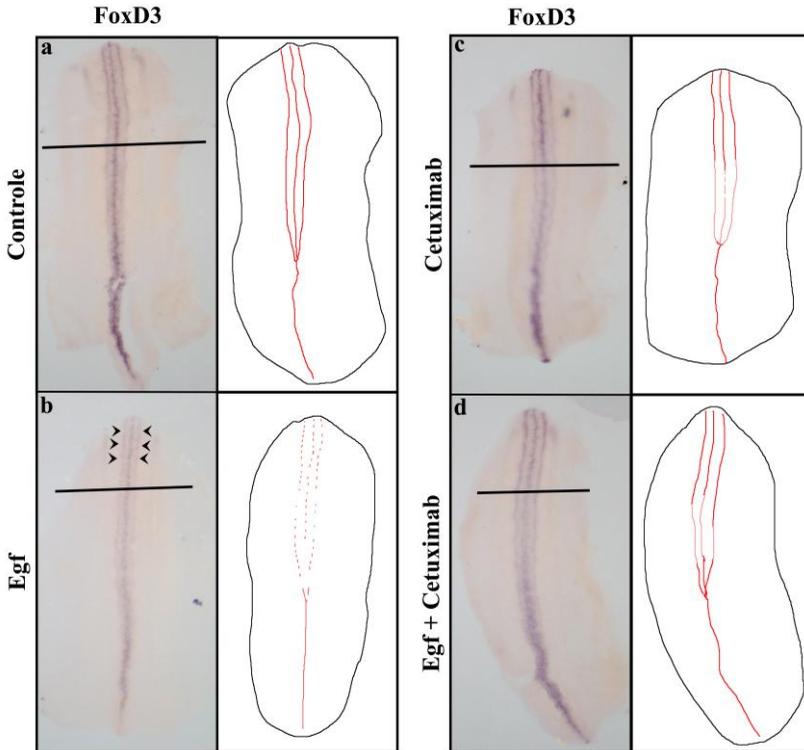
As células foram contadas quanto a sua marcação (BrdU, Mitf e DAPI) por meio de quatro fotos de cada poço/tratamento, sendo três placas com seis poços cada. Em cada foto foi contado manualmente o número de núcleos (DAPI), quantas células estavam marcadas com BrdU, quantas estavam marcadas para Mitf e quantas eram duplamente marcadas com Mitf e BrdU. As porcentagens foram relativizadas pelo número total de células contadas. Esses dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. Essas análises foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism[®].

5. RESULTADOS

5.1 Egf DIMINUI A EXPRESSÃO DE *FoxD3*

FoxD3 é um importante fator de transcrição para as células da CN, sendo sua expressão fundamental para que se inicie o processo de migração dessas células. No entanto, os progenitores de melanócitos precisam suprimir a expressão desse gene, já que *FoxD3* é um repressor direto de *Mitf* (fator de transcrição que inicia a diferenciação dos melanócitos). Podemos observar que há uma diminuição na expressão de *FoxD3* pelas células da CN quando tratadas com Egf (Figura 7b), em comparação com o controle (Figura 7a). É importante ressaltar que a redução na expressão de *FoxD3* é mais acentuada na região anterior do embrião. Isso indica que o Egf está provavelmente reduzindo a expressão de *FoxD3* nas células da CN que migram mais tardiamente, as progenitoras de melanócitos. Com os tratamentos com Cetuximab e Egf + Cetuximab não foi possível observar diferenças nos níveis de expressão de *FoxD3* em relação ao controle na região anterior (Figura 7c, d acima da linha), mas sim uma redução na região posterior do embrião (Figura 7c, d abaixo da linha). No entanto, é importante lembrar que essa metodologia, por oferecer apenas uma visão dorsal do domínio de expressão, apresenta certa limitação para quantificação. Para maior clareza, serão realizados, posteriormente, quantificações por RT-PCR semiquantitativo (Figura 7c, d).

Figura 7 – Efeito do Egf e Cetuximab sobre a expressão de *FoxD3*.



Fonte: Produzida pelo autor (2016).

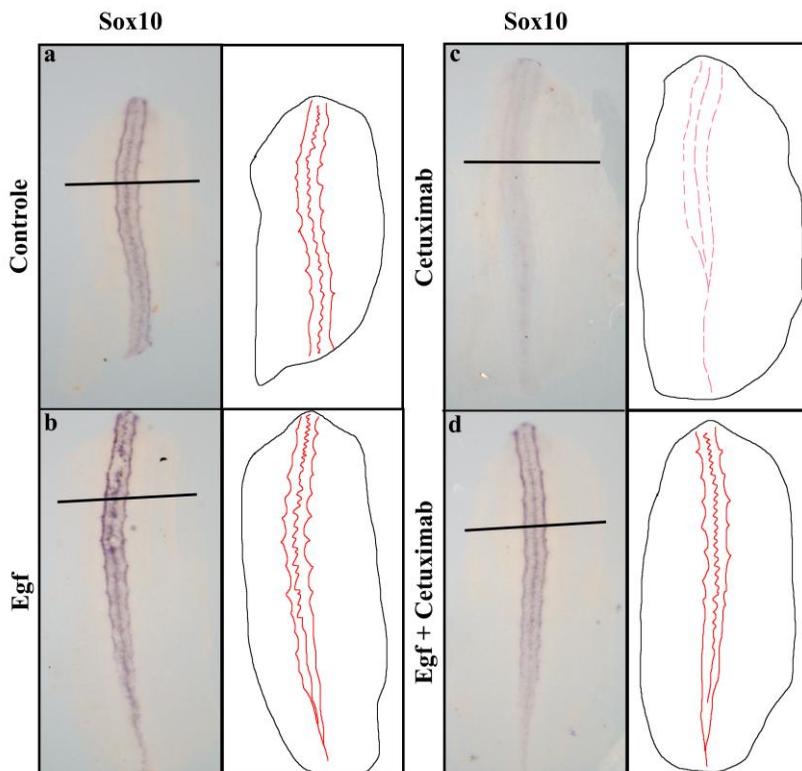
Nota: Segmento trunca de embrião controle (a), tratado com Egf (b), tratado com Cetuximab (c) e tratado com Egf + Cetuximab (d). A linha representa a divisão das regiões do segmento trunca, acima da linha a região anterior e abaixo da linha a região posterior. Todas as fotos estão em aumento de 1,8x. Ao lado de cada foto há um desenho representando as diferenças de expressão de *FoxD3*. Dados referentes a três culturas com três segmentos truncais para cada tratamento em cada cultura.

5.2 O BLOQUEIO DO EGF DIMINUI A EXPRESSÃO DE *Sox10* NA CN

Sox10 é um dos genes especificadores da CN, responsável pela sobrevivência das células da CN e necessário para o início da diferenciação de vários fenótipos originados das células da CN, entre eles, os melanócitos. O tratamento com EGF do segmento trunca de embriões, não demonstrou efeito sobre a expressão de *Sox10* nas células

da região anterior, mas parece ter reduzido discretamente a expressão de *Sox10* na região posterior (Figura 8a e b). No entanto, quando os segmentos trunciais dos embriões foram cultivados na presença do bloqueador de EgfR (Cetuximab), houve uma forte redução na expressão de *Sox10* em todo o segmento truncal do embrião (Figura 8c). Curiosamente, o tratamento concomitante do Egf + Cetuximab parece não ter tido efeito sobre a expressão de *Sox10*, quando comparamos ao controle (Figura 8d), no entanto, parecem ter recuperado o mesmo padrão de expressão do tratamento com Egf se comparamos as regiões posteriores dos segmentos trunciais.

Figura 8 – Efeito do Egf e Cetuximab sobre a expressão de *Sox10*.



Fonte: Produzida pelo autor (2016).

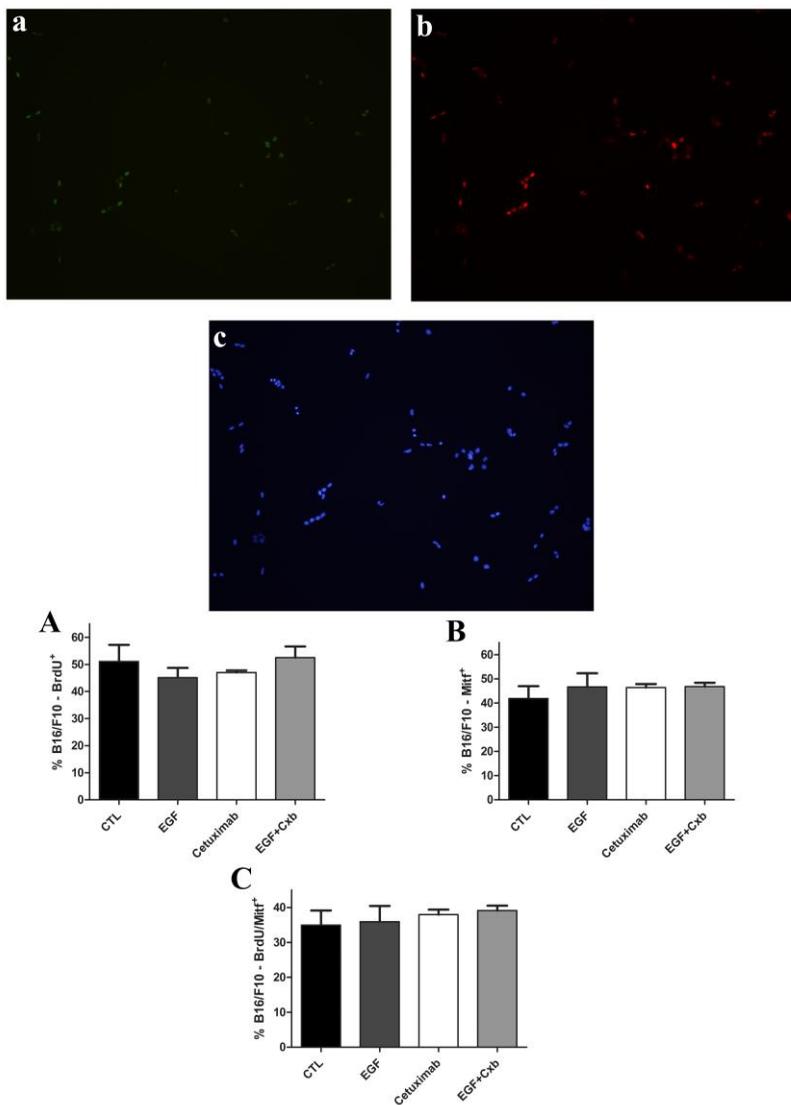
Nota: Segmento truncal de embrião controle (a), tratado com Egf (b), tratado com Cetuximab (c) e tratado com Egf + Cetuximab (d). A linha representa a divisão das regiões do segmento truncal, acima da linha a região anterior e abaixo da linha a região posterior. Todas as fotos estão em aumento de 1,8x. Ao

lado de cada foto há um desenho representando as diferenças de expressão de *Sox10*. Dados referentes a três culturas com três segmentos truncais para cada tratamento em cada cultura.

5.3 Egf NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16/F10) MITF⁺

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o Egf estimula a proliferação de progenitores da CN positivos para Mitf. Para verificar se esse mecanismo de controle está presente em outros derivados de melanócitos, foram realizados uma série de experimentos com células de melanoma murino B16/F10. Foram testadas duas concentrações de Egf, 10 ng/ml (a mesma utilizada em células da CN) e 100 ng/ml. Em ambos os tratamentos os efeitos observados foram os mesmos, sendo assim estão demonstrados graficamente apenas os dados referentes aos tratamentos de 100 ng/ml. Os tratamentos com Egf e Cetuximab não foram capazes de alterar a proliferação das células de melanoma (Figura 9A). Quando analisamos a proporção de células Mitf⁺ podemos observar que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos com Egf, Cetuximab e Egf+Cetuximab em comparação com o grupo controle (Figura 9B). Analisando apenas as proporções de células duplamente marcadas com BrdU/Mitf, também não foram observadas alterações significativas (Figura 9C).

Figura 9 – Gráficos da porcentagem de células B16/F10 marcadas com Mitf e BrdU.



Fonte: Produzida pelo autor (2016).

Nota: (a) Foto representativa do controle marcado para BrdU. (b) Foto representativa do controle marcado para Mitf. (c) Foto representativa do controle com marcador nuclear DAPI. (A) Gráfico de porcentagem de células BrdU⁺. (B) Gráfico de porcentagem de células Mitf⁺. (C) Gráfico de

porcentagem de células BrdU⁺ e Mitf⁺. Foram feitas culturas com Egf na concentração de 10 ng/ml e 100 ng/ml, ambas não tiveram diferenças estatísticas, sendo mostrado apenas os resultados para 100 ng/ml. As porcentagens mostradas nos gráficos foram relativizadas quando a quantidade de células totais nos tratamentos. Foram realizadas três culturas independentes, cada uma com os seis tratamentos. Não houveram diferenças significativas entre os grupos controle e os tratados.

6. DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores do nosso grupo apontam para um importante papel do Egf na diferenciação das células da CN, tanto para melanócitos quanto para neurônios (GARCEZ *et al.*, 2009). Além disso, demonstraram que células da CN na fase de migração apresentam receptores para Egf, *in vitro*, (TEIXEIRA, 2011). Dados recentes do grupo demonstraram que células da CN tratadas com Egf diminuíram a expressão de *FoxD3*, *in vitro* (dados não publicados). No entanto, nem todos os mecanismos moleculares associados a esse efeito são conhecidos, muito menos a validade dessa relação do Egf com *FoxD3* e *Sox10*, *in vivo*. Neste trabalho foi analisada a influência do Egf sobre os genes especificadores da CN, *FoxD3* e *Sox10*, dois principais reguladores da diferenciação das células da CN em melanócitos, *in vivo* (SOMMER, 2011). Além disso, utilizamos um modelo murino de melanoma para verificar se as relações entre Egf e *Mitf*, que foram observadas nas células da CN *in vitro*, também ocorrem em melanócitos neoplásicos.

A expressão de *FoxD3*, nos segmentos truncais de embriões, reduziu após tratamento com Egf (Figura 7b). Isso demonstra que os dados obtidos *in vitro* reproduzem o efeito observado *ex vivo*. Logo após o início da sua migração, as células da CN que seguem pela rota dorsolateral precisam ativar a expressão de *Mitf*, o principal fator de transcrição que controla a diferenciação dos melanócitos, para isso, no entanto, é necessário que a expressão de *FoxD3* seja reprimida, pois *FoxD3* é um repressor de *Mitf* (SOMMER, 2011). Nossos resultados indicam que o Egf, direta, ou indiretamente é capaz de promover a repressão de *FoxD3*. Isso levanta a possibilidade da sinalização Egf ter uma importante participação no início da diferenciação dos melanócitos. No entanto, o bloqueio do receptor para Egf mediante o tratamento com Cetuximab não demonstrou grandes alterações na expressão de *FoxD3* na região anterior. É importante lembrarmos que o Cetuximab bloqueia especificamente o EgfR, também conhecido como ErbB1. O Egf é capaz de se ligar a pelo menos outros 3 tipos de receptores (MCINNIS; SYKES, 1997). Esses resultados poderiam indicar que o efeito repressor do Egf sobre *FoxD3* não seria via EgfR. Outro ponto importante é o fato de que apenas uma pequena parte das células da CN, naturalmente, seguem pela rota dorsolateral, ou seja, têm a expressão de *FoxD3* reprimida para que possam diferenciar para melanócitos. Existe a possibilidade do tratamento com Cetuximab estar impedindo essa repressão, no entanto, pelo número reduzido de células que estariam

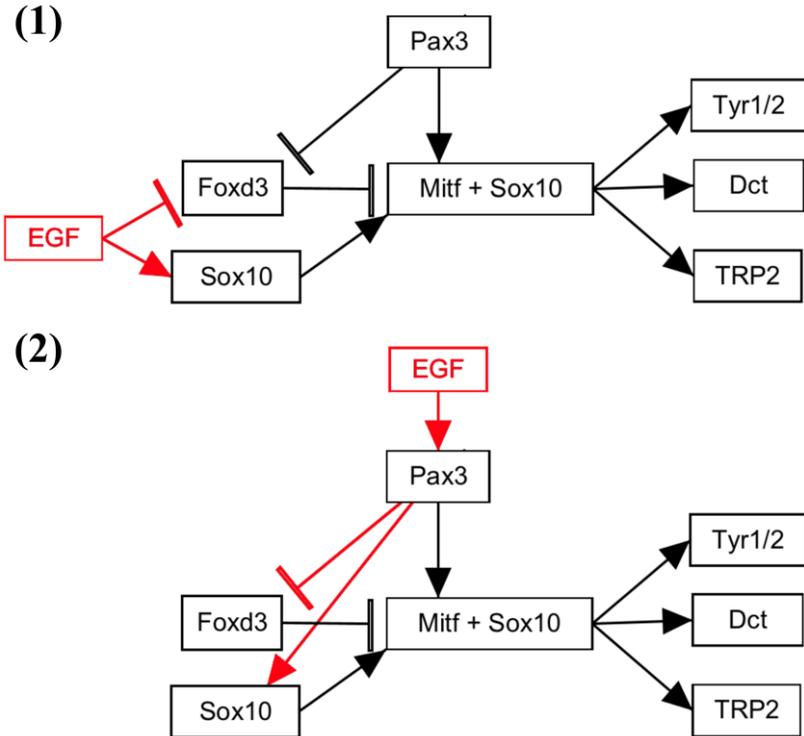
sujeitas a esse efeito, ele não seria detectável por hibridização *in situ whole-mount*. Abel e colaboradores mostraram em células de melanoma que o receptor ErbB3 (da mesma família do Egfr) é promovido pela expressão de *FoxD3*, responde a sinalização de neurogulina-1, e interage com o receptor ErbB2 (ABEL *et al.*, 2013). Esse receptor ErbB2 age como um amplificador de sinal e interage com ErbB1 também (MCINNES; SYKES, 1997). O que pode estar acontecendo é que a sinalização por Egfr recruta ErbB2 por meio de outros receptores que não Egfr, e pode estar aumentada a expressão de *FoxD3* quando há o bloqueio de Egfr com Cetuximab. Nesse caso ErbB1 (Egfr) teria um papel de reduzir a expressão de *FoxD3*, enquanto que outros receptores da mesma família, ErbB3/4, teriam o papel de aumentar essa expressão.

O tratamento do segmento truncal de embriões com Egf não alterou a expressão de *Sox10* na região anterior dos segmentos, quando comparamos ao grupo controle. Esse resultado, aparentemente poderia nos fazer acreditar que o Egf não tem influência sobre *Sox10*. No entanto, ao bloquearmos o Egfr com Cetuximab, a expressão de *Sox10* reduziu drasticamente, sugerindo que esse fator de transcrição é regulado pela sinalização de Egf. No desenvolvimento normal dos melanócitos, *Sox10* atua junto com *Mitf*, ativando outros genes efetores da diferenciação dos melanócitos, como *Tyr1/2*, *Dct*, *TRP2* (SOMMER, 2011). Isso nos mostra que o Egf parece ser necessário para manter a expressão de *Sox10* pelas células da CN, regulando o processo de diferenciação para melanócitos. Uma outra possibilidade é o tratamento com Cetuximab estar causando apoptose das células da CN, uma vez que alguns trabalhos apontam para o aumento de apoptose de células tratadas com o medicamento (PREWETT *et al.*, 1996). Curiosamente, o tratamento com Egf causou uma leve diminuição na expressão de *Sox10* na região posterior dos segmentos truncais dos embriões. Além disso, os tratamentos com Egf e Cetuximab juntos recuperaram a expressão de *Sox10*, mas com o padrão de expressão igual ao do tratamento com Egf. Esses dados nos levam a possibilidade de a expressão de *Sox10* ser controlada por Egfr, mas caso essa via esteja bloqueada, e havendo sinalização de Egf, outro receptor para Egf assume o papel para manter a expressão de *Sox10*. Nakano e colaboradores demonstraram que neuregulina-1/2, da mesma família dos Egfs, ligam-se a ErbB3 e ErbB4 e promovem a sobrevivência de neurônios (NAKANO *et al.*, 2016). Assim como outros membros da família dos Egfs, as neuregulinas possuem uma estrutura EGF-like (MCINNES; SYKES, 1997). Uma possibilidade é que uma maior presença do fator solúvel Egf acabe utilizando a sinalização ErbB3/4, o que explicaria a diferença nos

padrões de expressão de *Sox10* quando tratados com Egf, que é recuperado quando bloqueados os receptores ErbB1 (EgfR) e mantém o mesmo padrão do tratamento com Egf apenas. O fator de transcrição *Sox10* é necessário para diferenciação das células da CN em neurônios (SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008), o que também poderia explicar a mudança no padrão de expressão de *Sox10* caso as células que estariam sendo afetadas fossem neurônios advindos da CN. Prasad e colaboradores demonstraram que as células da CN expressam ErbB3 naturalmente, e que a expressão desse receptor é diretamente regulada por *Sox10* (PRASAD *et al.*, 2011). Outros autores tem demonstrado a importância de receptores ErbB3 para diferenciação da CN em células musculares (HO *et al.*, 2011) e da necessidade desse receptor na migração de células derivadas da CN para a medula óssea para formarem o nicho das células tronco mesenquimais de lá (ISERN *et al.*, 2014). Um estudo mais elaborado da possibilidade do Egf conseguir se ligar a esses receptores quando em grandes quantidades e afetar outros fenótipos celulares seria necessário para tirarmos melhores conclusões.

Apesar do efeito sobre a expressão de *FoxD3*, o Egf pode não estar regulando diretamente as expressões de *FoxD3* e *Sox10*, mas sim através de *Pax3* (Figura 10). *Pax3* é necessário para ativação de *Snail* e *FoxD3* na fase de formação das células da CN, e isso acontece quando *Pax3* e *Zic1* são ativados por sinalização Wnt (SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). No entanto, *Pax3* age como repressor de *FoxD3* quando as células da CN estão em fase migratória. Além disso, *Pax3* parece regular a expressão de *Sox10* (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004). Além disso, os sítios de ligação para *Sox10* e *Pax3* na região promotora de *Mitf* são bem próximos um do outro, e podem agir em conjunto para promoção de *Mitf* (GODING, 2000). Nessa hipótese, o Egf poderia estar regulando a expressão de *Pax3*, causando a diminuição da expressão de *FoxD3* e mantendo a expressão de *Sox10*. Essa repressão na expressão de *FoxD3* possibilitaria a expressão de *Mitf*, que é ativado por *Pax3* e *Sox10* em conjunto (SOMMER, 2011).

Figura 10 – Esquema das duas primeiras hipóteses do papel do Egf no mecanismo molecular de diferenciação dos melanócitos.



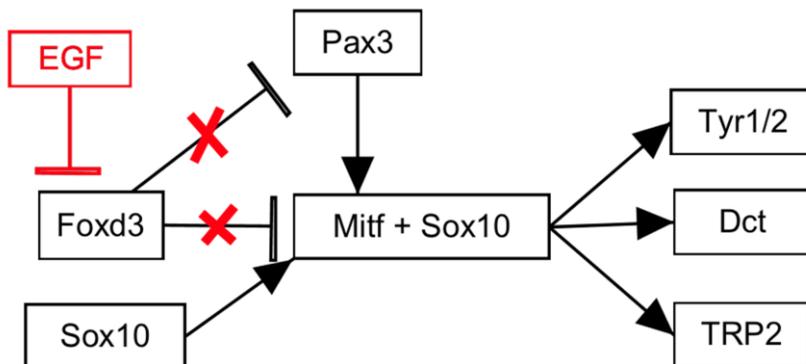
Fonte: Produzido pelo autor (2016).

Nota: (1) Esquema da hipótese do Egf estar regulando diretamente as expressões de *FoxD3* e *Sox10* na diferenciação das células da CN em melanócitos. (2) Esquema da hipótese do Egf estar regulando indiretamente as expressões de *FoxD3* e *Sox10*, por regular a expressão de *Pax3*. Em vermelho estão representadas as interações afetadas pelo Egf.

Há ainda uma terceira possibilidade, onde o Egf estaria reprimindo diretamente a expressão de *FoxD3* e indiretamente aumentando a expressão de *Pax3*. Thomas e Erickson demonstraram em células de melanoma murino que *FoxD3* liga-se a *Pax3* e impede que *Pax3* promova a expressão de *Mitf* (THOMAS; ERICKSON, 2009). Nesse modelo o Egf teria um papel apenas no *FoxD3*, mas refletiria na expressão de *Sox10*, já que *Pax3* promove expressão de *Sox10* (Figura

11). Para verificar essas hipóteses, análises futuras da expressão de *Pax3* sob tratamento com Egf e/ou Cetuximab poderão ser realizadas.

Figura 11 – Esquema da terceira hipótese do papel do Egf no mecanismo molecular de diferenciação dos melanócitos.



Fonte: Produzida pelo autor (2016).

Nota: Esquema da hipótese do Egf estar regulando a expressão de *FoxD3* diretamente, e por causa dessa regulação aumentar indiretamente a expressão de *Pax3* e *Sox10*, levando a diferenciação das células da CN para melanócitos. Em vermelho estão representadas as interações afetadas pelo Egf.

O Egf parece participar centralmente na regulação dos dois fatores de transcrição que principalmente afetam a diferenciação das células da CN para melanócitos. No entanto, não devemos nos manter presos a esse único fenótipo. *Sox10* é um fator de transcrição que atua nos mecanismos de diferenciação das células da CN em diversos outros fenótipos, como células de Schwann e neurônios simpáticos e parassimpáticos (SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). As células da CN migratórias expressam receptores para Egf (TEIXEIRA, 2011), e seria interessante identificar a importância desse fator nos mecanismos moleculares de diferenciação das células da CN dos outros fenótipos que elas geram.

Um exemplo seria um dos trabalhos anteriores do nosso grupo, que demonstrou que a diferenciação das células da CN para alguns fenótipos parece ser dosagem-dependente de *Sox10* (SIMÃO, 2015). Foram identificadas populações de células da CN com expressões de *Sox10* “forte”, “mediana” e “fraca” influenciadas pela proteína induzida por estresse tipo 1 (STI-1) (SIMÃO, 2015). O Egf poderia estar atuando em

conjunto com a proteína STI-1 na regulação da expressão de *Sox10* nas populações migratórias de células da CN.

As análises das células de melanoma murino (B16/F10) não renderam diferenças significativas entre os grupos, mesmo nos tratamentos com Egf na concentração de 100 ng/ml (10x mais concentrado que os tratamentos dos segmentos truncais de embrião). Apesar disso, alguns trabalhos já demonstraram que células de melanoma se comportam de maneiras diferentes quanto a seus mecanismos moleculares dependendo do tipo de melanoma. Enquanto Thomas & Erickson (2009) mostraram que *Pax3* é reprimido por *FoxD3*, diminuindo a expressão de *Mitf* por células B16/F10, outros trabalhos mostraram que em outro tipo de modelo de melanoma, *FoxD3* promove a expressão de *Pax3* (KUBIC *et al.*, 2016). Além disso, não podemos descartar a possibilidade da concentração de Egf que foi utilizada não ter sido suficiente, a maioria dos trabalhos que estudam efeitos de fatores de crescimento em células tumorais, utilizam os mesmos na ordem de µg/ml, pelo menos 10x mais que nossa maior concentração. Uma curva de Egf utilizando concentrações maiores poderá responder essa questão.

He e colaboradores, utilizando dados de 27 tipos de melanoma compararam a expressão de *Pax3* e *Mitf*. Esses autores chegaram a conclusão que cada tipo de melanoma tem seu mecanismo molecular modificado, quanto a expressão desses genes, comportando-se diferentemente em cada caso (HE *et al.*, 2011). Com base nesses dados, não é surpreendente que as células utilizadas nesse estudo não tenham repetido os efeitos encontrados nos experimentos realizados com tecidos embrionários.

Este trabalho foi o primeiro a mostrar que o Egf diminui expressão de *FoxD3* e regula a expressão de *Sox10* nas células da CNT *in vivo*. Isso indica que o fator solúvel Egf participa do controle molecular da diferenciação dos melanócitos, além de poder influenciar outros fenótipos originados das células da CN por sua regulação de *Sox10*. Análises mais detalhadas da expressão de *Pax3* e de outros receptores para Egf pelas células da CN auxiliarão em uma melhor compreensão não só do desenvolvimento dos melanócitos, bem como dos outros tipos celulares que necessitam de sinalização *Sox10*. Esse resultados abrem novas perspectivas, não apenas para a Biologia do Desenvolvimento, mas também para estudos de Terapia Celular.

7. CONCLUSÕES

- O tratamento com Egf diminui a expressão do fator de transcrição *FoxD3*, em células da CN.
- O tratamento com Egf não altera a expressão do fator de transcrição *Sox10* nas células da CN.
- O bloqueio do EgfR com Cetuximab diminui drasticamente a expressão de *Sox10*, em células da CN.
- Nossos dados sugerem que o Egf participa do mecanismo molecular de diferenciação dos melanócitos regulando os fatores de transcrição *FoxD3* e *Sox10*.
- Os tratamentos com Egf e o bloqueio do EgfR não alteram a expressão de *Mitf* em células de melanoma murino (B16/F10).

8. PERSPECTIVAS

Pax3 parece exercer um papel importante de mediação na sinalização de Egf para as células da CNT. Além disso, a influência de Egf na expressão de *Sox10*, o faz um candidato interessante para estudar sua sinalização em outros fenótipos derivados das células da CNT. Outro ponto importante é a expressão de *FoxD3* não ter sido muito bem visualizada nos tratamentos com bloqueador de EgfR, fazendo-se necessário outro método para visualização desse efeito. Os outros receptores da família Erb, mesma família do EgfR, são importantes para as células da CN, e seria interessante aprofundar os efeitos que o Egf poderia ter sobre eles, bem como seus padrões de expressão. Desta forma, como continuação desse trabalho, pretende-se analisar a localização de expressão do fator solúvel Egf em embriões de codorna, bem como a expressão de *Pax3* e *Mitf* com os tratamentos utilizados neste trabalho. Além de testar a ligação de Egf com os outros receptores Erb, que são presentes nas células da CN, e seus efeitos nos fenótipos derivados da CN. Esses resultados nos ajudarão a entender o papel do Egf nos mecanismos moleculares associados à diferenciação da crista neural.

9. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, B. D.; PRATT, R. M. Influence of retinoids and EGF on growth of embryonic mouse palatal epithelia in culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 4, p. 343–352, 1988.
- ABEL, E. V. et al. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 5, p. 2155–2168, 1 maio 2013.
- AKITAYA, T.; BRONNER-FRASER, M. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 194, n. 1, p. 12–20, 1992.
- ALORABI, M.; SHONKA, N. A.; GANTI, A. K. EGFR monoclonal antibodies in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: What is their current role? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 99, p. 170–179, mar. 2016.
- BERLANGA-ACOSTA, J. et al. Epidermal growth factor in clinical practice – a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. **International Wound Journal**, v. 6, n. 5, p. 331–346, 2009.
- BRASIL. **Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 25 jul. 2016.
- 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.
- BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 161–164, 1988.
- BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. **Neuron**, v. 3, n. 6, p. 755–766, 1989.
- CHEUNG, M. et al. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. **Developmental Cell**, v. 8, n. 2, p. 179–192, 2005.
- GANS, C.; NORTHUTT, R. G. Neural Crest and the Origin of Vertebrates: A New Head. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 268–273, 15 abr. 1983.
- GARCEZ, R. C. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087–1091, 2009.
- GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 10. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2013.
- GODING, C. R. Mitf from neural crest to melanoma: Signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. **Genes and Development**, v.

14, n. 14, p. 1712–1728, 2000.

HALL, B. K. The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 5, p. 781–793, 15 dez. 2008.

HALL, B. K. **The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution**. Boston, MA: Springer US, 2009.

HARI, L. et al. Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/ β -catenin signaling. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 12, p. 2107–17, 2012.

HE, S. et al. PAX3 knockdown in metastatic melanoma cell lines does not reduce MITF expression. **Melanoma Research**, v. 21, n. 1, p. 24–34, fev. 2011.

HO, A. T. VAN et al. Neural Crest Cell Lineage Restricts Skeletal Muscle Progenitor Cell Differentiation through Neuregulin1-ErbB3 Signaling. **Developmental Cell**, v. 21, n. 2, p. 273–287, ago. 2011.

ISERN, J. et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. **eLife**, v. 3, 25 set. 2014.

KARDONG, K. V. **Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2012.

KIRKPATRICK, P.; GRAHAM, J.; MUHSIN, M. Fresh from the pipeline: Cetuximab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 7, p. 549–550, jul. 2004.

KUBIC, J. D. et al. FOXD3 Promotes PAX3 Expression in Melanoma Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 533–541, fev. 2016.

LE DOUARIN, N. M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 19, p. 4637–50, 2004.

LEE, H. O.; LEVORSE, J. M.; SHIN, M. K. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. **Developmental Biology**, v. 259, n. 1, p. 162–175, 2003.

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.

MCINNES, C.; SYKES, B. D. Growth factor receptors: Structure, mechanism, and drug discovery. **Biopolymers**, v. 43, n. 5, p. 339–366, 1997.

MEULEMANS, D.; BRONNER-FRASER, M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. **Developmental Cell**, v. 7, n. 3, p. 291–299, 2004.

MURPHY, M. et al. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n. 12, p. 3519–3528, 1994.

NAKANO, N. et al. NTAK/neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes

- survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3. **Neuroscience Letters**, v. 622, p. 88–94, maio 2016.
- NIETO, M. et al. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5160, p. 835–839, 1994.
- PAK, O. **Cetuximab**. Disponível em: <<http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertreatment/Treatmenttypes/Biologicaltherapies/Monoclonalantibodies/Cetuximab.aspx>>. Acesso em: 1 jan. 2016.
- PLATT, J. B. Ectodermic origin of the cartilages of the head. **Anat. Anz.**, v. 8, p. 506–509, 1893.
- PRASAD, M. K. et al. SOX10 directly modulates ERBB3 transcription via an intronic neural crest enhancer. **BMC Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 40, 2011.
- PREWETT, M. et al. Anti tumor and cell cycle responses in KB cells treated with a chimeric anti EGFR monoclonal antibody in combination with cisplatin. **International Journal of Oncology**, v. 9, p. 217–224, 1996.
- SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 7, p. 557–68, 2008.
- SIMÃO, E. O. **A PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1 (STI-1) ATUA SOBRE A EXPRESSÃO DE SOX10 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO INICIAL DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL**. 2015. 73f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.
- SOMMER, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 411–421, 2011.
- STRAUSS, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 845– 881, 2005.
- TAN, X. et al. Epidermal growth factor receptor: A novel target of the Wnt/B-catenin pathway in liver. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 285–302, 2005.
- TEIXEIRA, B. L. **Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.
- TENG, L. et al. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. **Development**, v. 135, n. 9, p. 1615–1624, 26 mar. 2008.
- 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, p. 1849–1858, 2009.

TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2014.

WESTON, J. A. Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. In: BODE, H. R. (Ed.). **Current Topics in Developmental Biology**. 25. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 134–155.