

Eliza Simão de Oliveira

**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**

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
2015

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

Oliveira, Eliza

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 / Eliza Oliveira ; orientador, Ricardo Castilho Garcez - Florianópolis, SC, 2015.

73 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. STI-1. 4. Sox10. I. Castilho Garcez, Ricardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Eliza Simão de Oliveira

**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**

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, 7 de agosto de 2015.

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

Banca Examinadora:

Prof.^o Dr.^o Ricardo Castilho Garcez (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

M.^a Alice Heidrich Prompt (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Bianca Luise Teixeira (Membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado ao meu orientador, Ricardo. Por sempre me motivar e inspirar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu querido orientador, Professor Ricardo Castilho Garcez. Por me inspirar, ensinar e incentivar. Por toda a paciência durante minhas crises de desespero e por sempre acreditar que daria certo. Por todas as conversas sobre meu trabalho e também sobre a vida. Muito, muito obrigada por ter me acolhido e por todo o tempo dedicado a mim. Te admiro muito!

A Professora Andréa Trentin por abrir as portas do LACERT para mim. E aos Lacerteanos e Labcrinetes (haha), por toda a descontração no ambiente de trabalho, toda a ajuda quando necessário e aos merecidos “puxões de orelha”. Sei que estive ausente nos últimos tempos, mas acreditem que sempre estive lá acompanhando vocês sendo legais do jeito que são. Obrigada por todos os cafés da tarde na cozinha e as festas de arromba.

A todos os inesquecíveis professores que tive a oportunidade de conhecer durante a graduação e que fizeram toda a diferença: Paulo Hofmann, Margherita, Alberto Lindner, Edmundo Grisard e Paulinho.

A minha primeira orientadora, Danielle Mello, por me iniciar no mundo científico, por ser uma companhia alegre e por lembrar-se de mim até hoje. Foi bom iniciar essa jornada com você! Também lembro sempre com muito carinho de você (mesmo que tenha me feito passar algumas madrugadas no laboratório, haha).

Aos amigos mais “irrelevantes” que eu poderia ter. Os maiores responsáveis pela minha permanência na Biologia e que me mostraram que sempre é possível encontrar alguém parecido com você. O grupo mais criativo, composto por integrantes peculiares e únicos: Mariba (a voz da sapiência), sempre com opiniões sensatas, idéias criativas e trocadilhos fantásticos. Gug com sua ironia sem igual e suas frescuras com comidas. Dani com seu jeitinho meigo e maravilhado com a vida. JG com sua capacidade imensa de me irritar e ao mesmo tempo uma das pessoas cuja opinião eu mais respeito. Andy, o perdido mais carinhoso. Grosi, o negro gato que nos abandonou para seguir a carreira da fama (mas ainda o amamos!). May, com seu jeitinho de menina, força de mulher e sempre com braços abertos para um “upa” carinhoso. Panda, nosso consultor oficial sobre as burocracias do curso e muitas vezes da vida. Chun (a japa) que nos concedeu dois rebentos Irrelevantes de uma vez, Marcelo e Felipe. Tabatata, com suas broncas de mãe sem nunca perder a fofura. Candorga, com suas “piras” e genialidade. E principalmente, Pri (minha irmãzona), quem mais

me ouviu e me aconselhou nos tantos caos no meio da faculdade e quem mais acreditou em mim (até mesmo quando eu já não acreditava). Obrigada por fazerem esses anos serem mais leves, felizes e cheios de abraços coletivos!

A todos os outros aspirantes a biólogos ou agregados com quem esbarrei durante esses anos da graduação, durante as Horas Felizes, Semana da Bio, EREB, almoços na feirinha e tudo mais. Marcela, Laura, Luiza, Thaís, Caiâne, Drica, Henrique, Renato e tantos outros que me acompanharam por um curto ou longo período, enchendo minha alma de sentimentos. Vocês também fazem parte de tudo isso!

Àqueles que conheci no meu intercâmbio na deslumbrante cidade do Porto e que participaram dos momentos mais intensos da minha vida. Vivian, Lara, Bianca, Luan, Jonathan, Ariane, Lucile e Willian. É incrível e muito feliz manter vocês na minha vida! Vocês são a prova de que a amizade verdadeira pode se manter mesmo à distância e ainda se fortalecer! E vamos seguindo sempre dando um jeitinho de estarmos juntos outra vez.

Ao Diogo, meu companheiro, por me tirar da rotina e conseguir me fazer feliz depois de um dia estressante. Bonito, obrigada por me ensinar a viver como se não houvesse amanhã. Te amo!

À família mais linda do mundo! Pelos melhores irmãos que eu poderia ter, os quais são grandes amigos e fontes de inspiração. Gabriel, Jonas, Daniel e Mariana, tenho orgulho demais de vocês! A minha cunhada, Fabiana, por todo carinho e por me dar meu maior presente, o Mateus. Ao meu pai, Lelo, que apesar dos grandes problemas de convivência me mostrou o que é ter um coração enorme. E, principalmente, a minha mãe, Neli, por entender (quase sempre, hehe) meus momentos de estresse e me apoiar neles, por sempre buscar fazer o melhor por mim. Família, amo vocês!

Por fim, ao CNPq pelas bolsas PIBIC durante a graduação e minha bolsa Ciências sem Fronteiras, a qual proporcionou uma das experiências mais incríveis da minha vida.

**“C`est la vie,
Ça va passer”**

RESUMO

A Proteína induzida por estresse do tipo I (STI-1) é uma co-chaperona que pode ser secretada e atuar como um fator solúvel. Nosso grupo foi o primeiro a mostrar que STI-1 estimula a diferenciação das células da crista neural truncal (CNT) para neurônios e melanócitos, em detrimento da diferenciação para células gliais. STI-1 mostrou ter efeito sobre a diferenciação das células da CNT apenas nas fases iniciais de cultivo. Para compreender melhor os mecanismos moleculares associados a esse efeito, nós avaliamos a influência de STI-1 sobre a expressão de Sox10, considerado o principal regulador da diferenciação inicial das células da crista neural. Células da CNT foram cultivadas durante 48 horas em meio controle e em meio básico suplementado com STI-1 (10 ng/ml). Após esse período foi realizada imunocitoquímica para Sox10 e em seguida, os níveis de expressão de Sox10 foram analisados pela intensidade de fluorescência emitida por cada célula. As células da população controle e tratada com STI-1 foram divididas em três grupos de expressão de Sox10: células com expressão de Sox10 fraca, mediana e forte. Também foi analisada a influência de STI-1 sobre a proliferação celular através de dois experimentos: contagem direta de células que deixaram o tubo neural durante as primeiras 24 horas de cultivo e análise da incorporação de BrdU durante a última hora de cultivo. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com STI-1 altera o padrão populacional de expressão de Sox10 nas células da CNT e, ainda, induz alterações na expressão de Sox10 em grupos distintos, levando a um aumento do número de células com expressão mediana de Sox10 em detrimento de células com expressão fraca. Além disso, não foram observadas alterações na proliferação celular durante o tratamento com STI-1, quando comparado à condição controle. Este dado indica que STI-1 atua diretamente sobre o controle da expressão de Sox10. Este trabalho é o primeiro a fazer uma análise de expressão de Sox10 em células da CNT de forma individualizada, considerando a heterogeneidade da população. Tal análise permitiu concluir que a STI-1 promove o aumento da expressão de Sox10 nas células da CNT, nas fases iniciais de diferenciação.

Palavras-chave: crista neural, Sox10, STI-1

ABSTRACT

Stress-inducible protein 1 (STI-1) is a co-chaperone that can be secreted and act as a soluble factor. Our group was the first to show that treatment with recombinant STI-1 promotes differentiation of trunk neural crest (TNC) cells to neurons and melanocytes in detriment of glial differentiation. Treatment with STI-1 showed to have effect over the differentiation of the TNC cells only in the initial phases of culture period. In order to better understand the molecular mechanisms associated with this effect, we evaluated the STI-1 influence over Sox10 expression, considered the main transcription factor that coordinates the initial differentiation of neural crest cells. TNC cells were cultivated during 48 hours in a control media and in a basic media supplemented with STI-1 (10 ng/ml). After this period, immunolabeling for Sox10 was conducted and then the Sox10 expression levels were analyzed by fluorescence intensity emitted by each cell. The cells of the population control and of the population treated with STI-1 were divided in three different groups of Sox10 expression: cells with weak, medium and strong Sox10 expression. It was also analyzed the STI-1 influence over cell proliferation through two experiments: direct counting of cells which migrate from the neural tube during the first 24 hours of culture period and analysis of BrdU incorporation during the last hour of culture period. The results obtained showed that treatment with STI-1 alters the Sox10 expression population standard in the TNC cells and also induces alterations in the Sox10 expression in distinct groups, leading to an increase in the number of cells with medium Sox10 expression in detriment of cells with weak expression. Besides, we did not observe changes in the cells proliferation during the treatment with STI-1, when compared to the control condition. This data indicates that STI-1 would be acting over the Sox10 expression control. This is the first study to make an individual analysis of Sox10 expression in the TNC cells, considering the heterogeneity of the population. This analysis allowed the conclusion that the STI-1 promotes the increase of Sox10 expression in the TNC cells, in the initial phases of differentiation.

Keywords: neural crest, Sox10, STI-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado do processo de neurulação e formação da crista neural.....	22
Figura 2- Fatores responsáveis pela indução da crista neural.	24
Figura 3- Mapa dos fenótipos originados a partir da crista neural cefálica e truncal.	27
Figura 4- Rotas de migração das células da crista neural truncal.	28
Figura 5- Sox10 induz a diferenciação das células da crista neural.	31
Figura 6- Esquema representativo da metodologia utilizada para a cultura de células da CNT de embrião de codorna.	39
Figura 7- Efeito de STI-1 sobre a expressão total de Sox10.	44
Figura 8- Análise da expressão de Sox10 em células individualizadas.	46
Figura 9- Esquema da estratégia utilizada para divisão das células em grupos de expressão de Sox10.....	48
Figura 10- Efeito do STI-1 na expressão de Sox10 analisada por grupos de expressão.	49
Figura 11- Efeito de STI-1 sobre a proliferação celular total.	50
Figura 12- Análise de proliferação das células pertencentes aos diferentes grupos de expressão de Sox10.	52
Figura 13- STI-1 exerce influência na expressão de Sox10 nas células da crista neural truncal.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos utilizados na análise de imunofluorescência.....	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-2	Do inglês <i>Activating protein 2</i>
Bmp	Do inglês <i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética de osso)
BrdU	5- bromo-2'-deoxiuridina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
c-Myc	Do inglês <i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>
CN	Crista Neural
CNC	Crista neural cefálica
CNT	Crista neural truncal
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
Dct/TRP2	Do inglês <i>Dopachrome tautomerase</i>
Dlx	Do inglês Distal-less homeobox
Ednrβ	Do inglês <i>Protein-coupled endothelin receptor-beta</i>
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic</i>
EE	Extrato de embrião
Egf	Do inglês <i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidermal)
Et3	Endotelina3
Fgf	Do inglês Fibroblast growth factor (Fator de crescimento de fibroblasto)
FoxD3	Do inglês Forkhead box D3
Ggf	Do inglês <i>Glial growth factor</i> (Fator de crescimento glial)
HCl	Ácido clorídrico
Hsp70	Do inglês <i>Heat shock protein 70</i>
Hsp90	Do inglês <i>Heat shock protein 90</i>
Id	Do inglês <i>Inhibitor of DNA binding</i>
Mash	Conhecido como <i>Ascl1</i> (do inglês <i>Achaete-scute complex homolog 1</i>)
Mbp	Do inglês <i>Myelin basic protein</i>
Mitf	Do inglês <i>Microphtalmia-associated transcription factor</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
Ngf	Do inglês <i>Nerve Growth Factor</i> (Fator de crescimento nervoso)
Ngn1	Neurogenina1
P0	Proteína zero
Pax	Do inglês Paired box
PBS	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> (Salina de fosfato tamponada)
Phox2b	Do inglês <i>Paired-like homeobox 2b</i>
Plp	Do inglês <i>Proteolipid protein</i>
PrP^c	Do inglês <i>Cellular prion protein</i> (Proteína príon celular)

RhoB	Do inglês <i>Ras homolog gene family, member B</i>
SBF	Soro bovino fetal
Shh	Do inglês <i>Sonic Hedgehog</i>
Sox	Do inglês <i>Sry-related HMG box, 10</i>
STI-1	Do inglês <i>Stress-inducible protein1</i> (Proteína induzida por estresse do tipo I)
UA	Unidade arbitrária
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UR	Umidade relativa
Wnts	Do inglês <i>Wingless-Int protein</i>
Zic	Do inglês <i>Zinc finger of the cerebellum</i>
α-MEM	Do inglês <i>α-modified minimum essential médium</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.....	21
1.1. A CRISTA NEURAL.....	21
1.2. INDUÇÃO DA CRISTA NEURAL.....	22
1.3. POTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CN.....	25
1.4. FATORES QUE CONTROLAM A MIGRAÇÃO E ADIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN.....	29
1.4.1. Fatores de transcrição.....	29
1.4.2. Fatores solúveis.....	32
1.5. A PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. OBJETIVO GERAL.....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNA.....	37
4.2. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT.....	37
4.3. CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS PARA ANÁLISE DE IMUNOCITOQUÍMICA.....	37
4.4. IMUNOCITOQUÍMICA.....	40
4.5. ANÁLISE DE DADOS.....	41
4.5.1. Análise da expressão de Sox10.....	41
4.5.2. Análise de proliferação.....	41
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. STI-1 NÃO ALTERA A EXPRESSÃO TOTAL DE SOX10 EM CÉLULAS DA CNT.....	43
4.2. STI-1 ALTERA O PADRÃO DE EXPRESSÃO DE SOX10 EM CÉLULAS INDIVIDUALIZADAS DA CNT.....	45
4.3. STI-1 ALTERA DE MANEIRA DIFERENCIAL A EXPRESSÃO DE SOX10 NAS CÉLULAS DA CNT.....	47
4.4. STI-1 NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO CELULAR TOTAL.....	49
4.5. STI-1 NÃO ALTERA DE MANEIRA DIFERENCIAL A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS PARA SOX10.....	51
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	61
7. PERSPECTIVAS.....	63
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	65

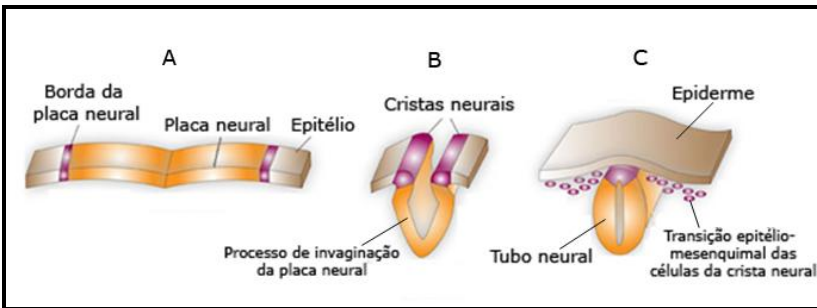
1. INTRODUÇÃO

1.1. A CRISTA NEURAL

A crista neural (CN) foi primeiramente identificada pelo embriologista suíço Wilhelm His, em 1868. Ele observou a existência de uma banda transitória de células localizada entre a epiderme e a placa neural de embriões de ave. His chamou essas células de *Zwischenstrang* (cordão intermediário). O termo “crista neural” foi usado pela primeira vez por Arthur Milnes Marshall em 1879 (HALL, 2008). Hoje se sabe que essa é uma estrutura embrionária temporária de vertebrados que dará origem a uma grande diversidade de tipos celulares, em diversos órgãos e estruturas do corpo. Essa ampla variedade de tipos celulares formados pelas células da CN e o mecanismo básico pelo qual ela é formada (transição epitélio-mesenquimal na linha média do embrião) fez com que ela fosse considerada, por alguns autores, como quarto folheto embrionário (HALL, 2009; GILBERT, 2014).

As células da crista neural são formadas nas bordas dorsais do tubo neural de vertebrados durante a fase de neurulação (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999) (**Figura 1**). Após indução, que ocorre por meio de uma complexa conversa molecular entre vários tecidos embrionários, as células da CN sofrem transição epitélio-mesenquimal, se desprendem das bordas dorsais do tubo neural e migram como uma população mista de precursores em vários estágios de diferenciação, com alta taxa de proliferação (TRAINOR, 2014). Nos embriões de mamíferos, a migração das células da CN inicia um pouco antes da fusão das pregas da placa neural. Já nos embriões de aves, a migração começa logo após o fechamento do tubo neural, com as células migrando primeiramente da região anterior do tubo e estendendo-se progressivamente até a região caudal (TRAINOR, 2005).

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



Fonte: Adaptado de ROSS & ZARBALIS, 2014.

Nota: (A) Durante o processo de neurulação, o ectoderma se divide em ectoderma não-neural (em marrom) e placa neural (em alaranjado). Entre eles surge uma faixa de células denominada de borda da placa neural (em roxo). (B) As bordas da placa neural se elevam (e passam a ser chamadas de crista neural) ao mesmo tempo em que ocorre a invaginação da placa neural. (C) Após o fechamento do tubo neural (em laranja), as células da crista neural sofrem transição epitélio-mesenquimal, se desprendem do dorso do tubo neural e migram até seu destino final.

1.2. INDUÇÃO DA CRISTA NEURAL

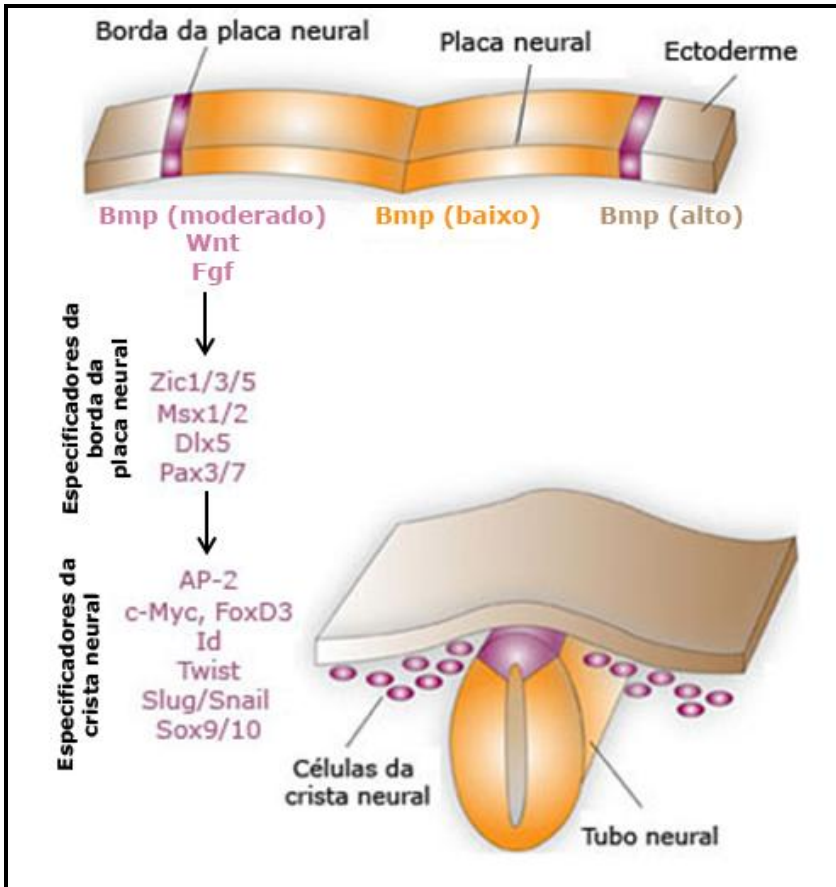
A indução da CN, classicamente descrita como um processo que ocorre durante a formação da placa neural, é iniciada em resposta a um conjunto de eventos sinalizadores e fatores solúveis produzidos pelo ectoderma não-neural adjacente, o neuroepitélio, pelo mesoderma paraxial e notocorda, destacando-se a participação de Bmps (proteínas morfogenéticas de osso), Wnts (proteínas *wingless-Int*) e Fgfs (fatores de crescimento de fibroblasto) (MARCHANT *et al.*, 1998; GARCIA-CASTRO, MARCELLE & BRONNER-FRASER, 2002; MONSORO-BURQ, FLETCHER & HARLAND, 2003; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008).

Durante a fase de indução, observa-se a formação de um gradiente de concentração de Bmps próximo ao epitélio do embrião em desenvolvimento. Altos níveis de Bmps induzem a formação do epitélio não-neural, enquanto a inibição dos sinais de Bmp induz a expressão dos fatores de transcrição que levam à formação da placa neural. Por fim,

níveis moderados de Bmp levam à indução da crista neural em si (MARCHANT *et al.*, 1998). É claro que a sinalização de Bmp não pode explicar sozinha os processos de indução e, portanto, outras vias também estão envolvidas (SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). Além disso, pesquisas recentes têm indicado que a especificação da CN inicia muito antes da formação da placa neural, ainda na fase de gastrulação (BASCH, BRONNER-FRASER & GARCIA-CASTRO, 2006; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008).

Níveis intermediários de Bmp presentes na ectoderme que dará origem à CN, juntamente com a presença de Wnt e Fgf, levam à expressão de um pequeno grupo de fatores de transcrição conhecidos como “especificadores da borda da placa neural”. Nesse grupo de genes estão incluídos: *Zic1/3/5*, *Pax3/7*, *Dlx5* e *Msx1/2*. A expressão combinada desses fatores equipa as células com um conjunto de ferramentas moleculares, para que mais tarde elas respondam aos sinais adequados e tenham competência para formar as células da crista neural (SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). Assim, sugere-se que esses genes levem à expressão dos fatores de transcrição conhecidos como “especificadores da crista neural” (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004) (**Figura 2**).

Figura 2- Fatores responsáveis pela indução da crista neural.



Fonte: Adaptado de ROSS & ZARBALIS, 2014.

Nota: Níveis intermediários de Bmp, juntamente com Wnt e Fgf, levam à expressão dos genes especificadores da borda da placa neural, tais como *Msx1/2*, *Zic1/3/5*, *Dlx5* e *Pax3/7*. Esses genes, por sua vez, induzem a especificação da crista neural que ocorre devido a expressão de *AP-2*, *c-Myc*, *FoxD3*, *Id*, *Twist*, *Slug/Snail* e *Sox9/10*. Após o fechamento do tubo neural, esses fatores são capazes de induzir a migração e os primeiros passos da diferenciação das células da crista neural.

Os principais especificadores expressos pelas células da CN são: *AP-2*, *c-Myc*, *FoxD3*, *Id*, *Twist*, *Slug/Snail Sox9/10* (MARTINSEN & BRONNER-FRASER, 1998; LABONNE & BRONNER-FRASER, 2000; SASAI, MIZUSEKI & SASAI, 2001; SPOKONY *et al.*, 2002; BELLMEYER *et al.*, 2003; HONORE, AYBAR & MAYOR, 2003; LUO *et al.*, 2003). Todos esses fatores são expressos pelas células pré-migratórias e migratórias da crista neural e requerem sinalização Wnt para serem ativados. No entanto, a relação entre eles ainda não é clara. Sabe-se que esses especificadores influenciam uns aos outros, diretamente ou por meio de fatores secundários, criando uma complexa rede regulatória necessária para manter a expressão coletiva desses genes e, portanto, o estado de célula da crista neural (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004).

Essa rede composta por múltiplos reguladores guiam a aquisição de propriedades específicas como a multipotencialidade e a capacidade migratória, além de conferir proteção contra apoptose e levar ao processo de diferenciação final das células da crista neural (SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). O papel dos “especificadores da crista neural” sobre a migração e diferenciação da crista neural será abordado com mais detalhes no decorrer do texto.

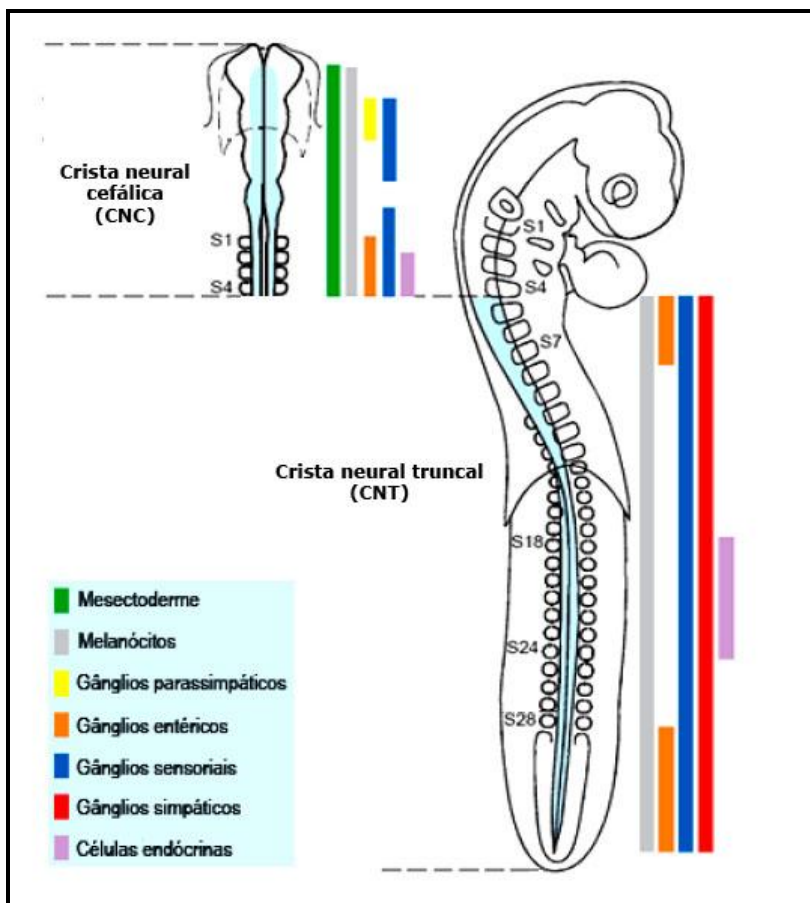
1.3. POTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CN

A população de células da CN é bastante heterogênea, sendo composta por progenitores comprometidos com uma linhagem celular específica, progenitores oligopotentes e também por progenitores multipotentes (capazes de se diferenciar em neurônios, células gliais, melanócitos, miofibroblastos, condrócitos e osteócitos) (TRENTIN *et al.*, 2004; CALLONI, LE DOUARIN & DUPIN, 2009). Essa heterogeneidade das células da CN e sua capacidade de originar diversos tipos celulares de forma coordenada podem ser explicadas por dois processos: células já programadas para se diferenciar em linhagens específicas, antes mesmo de se dispersarem pelo corpo ou, células que permanecem multipotentes até que sejam especificadas por sinais provenientes do ambiente para onde migram (GAMMILL & ROFFERS-AGARWAL, 2010; RUHRBERG & SCHWARZ, 2010). Além disso, a potencialidade das células da CN é bastante influenciada pela sua região de origem ao longo do eixo ântero-posterior (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999) (**Figura 3**).

A CN pode ser dividida em dois grandes domínios funcionais, ao longo do eixo ântero-posterior: crista neural cefálica (CNC) e crista

neural truncal (CNT). As células originadas da CNC, localizada anteriormente, são responsáveis pela formação de parte dos neurônios periféricos, células gliais, melanócitos, células musculares lisas, adipócitos e quase todo o tecido conjuntivo e esquelético da cabeça e pescoço. Já as células originadas da CNT, localizada posteriormente, são responsáveis pela formação de melanócitos, células adrenomedulares e todos os neurônios e células gliais pertencentes aos gânglios periféricos (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; HALL, 2009; GILBERT, 2014) (**Figura 3**). Importante notar que as células da CNC dão origem, *in vivo*, a derivados mesenquimais (tecido conjuntivo e esquelético), enquanto as células da CNT possuem a capacidade de originar derivados mesenquimais apenas *in vitro* (MCGONNELL & GRAHAM, 2002; IDO & ITO, 2006; CALLONI *et al.*, 2007; AGUIAR, 2012). As células que darão origem aos derivados mesenquimais da CNC são também chamadas de ectomesênquima ou mesectoderma para diferenciá-los dos derivados mesenquimais originados a partir do mesoderma (DUPIN, CALLONI & LE DOUARIN, 2010).

Figura 3- Mapa dos fenótipos originados a partir da crista neural cefálica e truncal.



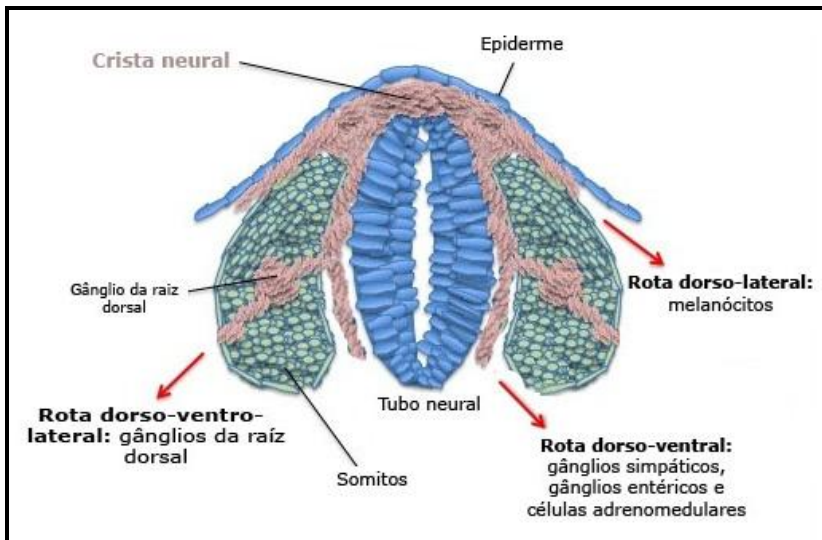
Fonte: Adaptado de LE DOUARIN *et al.*, 2004.

Nota: A figura representa os tipos celulares e estruturas derivadas das células da crista neural, os quais variam de acordo com a região do eixo antero-posterior da qual são originados. À esquerda estão representados os tecidos originados da crista neural cefálica (CNC) e à direita os tecidos originados da crista neural truncal (CNT). Mesectoderma (em verde) e gânglios parassimpáticos (amarelo) derivam apenas da CNC. Já os melanócitos (cinza) são produzidos ao longo de todo o eixo neural. Gânglios entéricos (alaranjado) são originados da região que corresponde do 1º ao 7º somito e da região posterior ao 28º somito. Os gânglios sensoriais (azul) são originados de praticamente toda a região da CNC e a partir

de toda a região da CNT. Gânglios simpáticos (vermelho) derivam de toda a região da CNT. Por fim, as células endócrinas (roxo) derivam da região final da CNC e da região central da CNT.

Na região cefálica, as células da CN migram no sentido dorso-ventral, formando o mesênquima da região craniofacial. Já na região truncal, as células podem migrar por três rotas principais: um primeiro grupo migra pela metade anterior de cada somito, formando os gânglios da raiz dorsal (rota dorso-ventro-lateral). Outro grupo de células migra paralelo ao tubo neural e são responsáveis pela formação dos gânglios simpáticos, gânglios entéricos e células adrenomedulares (rota dorso-ventral). E, por fim, em outra onda de migração, as células da CN seguem adjacentes à ectoderme do embrião (rota dorso-lateral) originando, em sua maioria, os melanócitos da pele (RICKMANN, FAWCETT & KEYNES, 1985; BRONNER-FRASER, 1986; TEILLET, KALCHEIM & LE DOUARIN, 1987) (**Figura 4**).

Figura 4- Rotas de migração das células da crista neural truncal.



Fonte: Adaptado de RUGGERI *et al.*, 2013.

Nota: Após se desprenderem do dorso do tubo neural, as células da crista neural podem seguir por três rotas distintas: rota dorso-lateral dando origem aos

melanócitos. Rota dorso-ventral, dando origem aos gânglios simpáticos, gânglios entéricos e as células adrenomedulares. E rota dorso-ventro-lateral, dando origem aos gânglios da raiz dorsal (gânglios sensoriais).

1.4. FATORES QUE CONTROLAM A MIGRAÇÃO E A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

Os mecanismos moleculares que controlam o destino das células da crista neural não são completamente compreendidos. Sabe-se que as células da CN migram por rotas temporalmente e espacialmente definidas por um conjunto de proteínas presentes no microambiente embrionário, as quais podem tanto atrair como repelir a migração das células da CN. A diferenciação final destas células será determinada tanto por características intrínsecas, ou seja, pelo padrão de expressão de fatores de transcrição e marcas epigenéticas, bem como pelo conjunto de fatores encontrados no microambiente presente na rota de migração (GAMMILL & ROFFERS-AGARWAL, 2010; SIMÕES-COSTA & BRONNER, 2015).

1.4.1. Fatores de transcrição

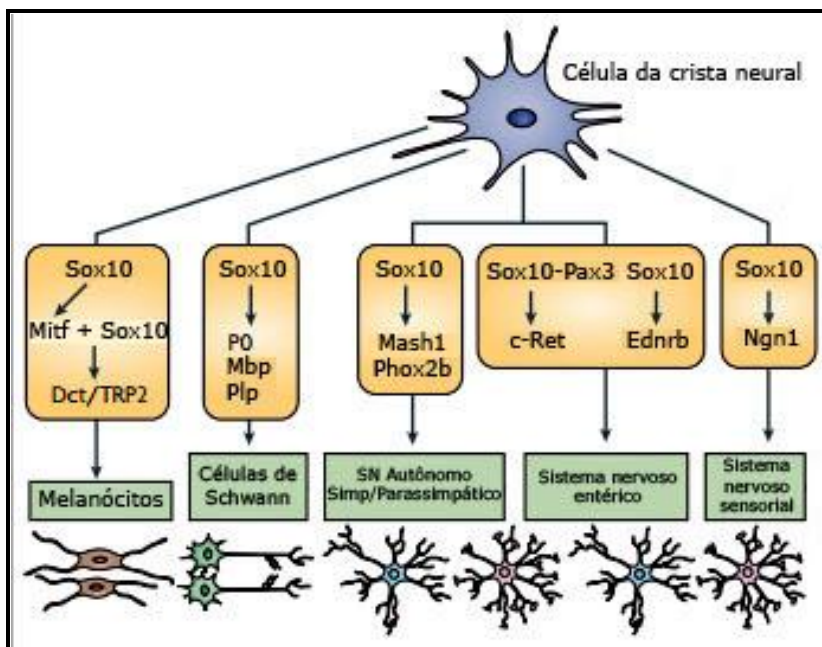
Como mencionado em tópico anterior, os “especificadores da crista neural” não apenas se auto-regulam para manter sua expressão coletiva, como também controlam muitos mediadores da migração e diferenciação das células da CN. Assim, desde sua especificação até sua diferenciação final, as células da CN são conduzidas por essa rede regulatória de genes (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004).

A expressão desses fatores provoca alterações nos mecanismos de adesão e na citoarquitetura dessas células, o que é necessário para que ocorra a transição epitélio-mesenquimal e as células da CN assumam seu caráter altamente migratório (FUKATA & KAIBUCHI, 2001). Por exemplo, a expressão de *FoxD3* está associada ao fato das células da CN deixarem de expressar N-caderina, molécula que permite que essas células estejam fortemente aderidas às demais no neuroepitélio (AKITAYA & BRONNER-FRASER, 1992; DUBAND *et al.*, 1995; CHEUNG *et al.*, 2005). Outro exemplo, é o fator *RhoB* que, estimulado pelo fator de transcrição *Slug*, provoca alterações no citoesqueleto das células da CN, levando-as para o processo de migração (LIU & JESSELL, 1998; DEL BARRIO & NIETO, 2002).

Além disso, a expressão dos “especificadores da crista neural” também leva à expressão de outros genes efetores que permitirão a diferenciação final das células da CN (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004). É importante ressaltar que o balanço preciso entre esses fatores determinará o destino celular, sendo que esse controle fino é realizado pelo microambiente encontrado pelas células da CN durante sua migração.

Dentre esses fatores de transcrição, membros da família *Sox* têm assumido um importante papel no desenvolvimento da CN. Trabalhos têm colocado *Sox10* como um dos maiores reguladores da formação e diferenciação da CN (AOKI *et al.*, 2003; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). A expressão de *Sox10* é necessária para que ocorra a melanogênese, a gliogênese e a neurogênese das células da crista neural, por meio da ativação de genes especificadores desses fenótipos tais como *Mitf*, *Mash1*, *P0* e *c-Ret* (MEULEMANS & BRONNER-FRASER, 2004; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008) (**Figura 5**).

Figura 5- Sox10 induz a diferenciação das células da crista neural.



Fonte: Adaptado de SAUKA-SPLENGER & BRONNER-FRASER, 2008.

Nota: O processo de diferenciação das células da CN envolve um conjunto de genes especificadores da crista neural, sendo *Sox10* um dos principais genes envolvidos. Durante a diferenciação para melanócitos, *Sox10* regula a expressão de *Mitf* e juntos esses fatores controlam a expressão de uma enzima que é essencial para a síntese de melanina, *Dct/TRP2*. No sistema nervoso autônomo, *Sox10* controla a expressão de *Mash1* e *Phox2b*, os quais são responsáveis pela diferenciação para neurônios simpáticos. *Sox10* também regula a expressão de *Neurogenina1 (Ngn1)* a qual leva a diferenciação para neurônios sensoriais. Durante a especificação das Células de Schwann, *Sox10* regula *P0*, *Mbp* e *Plp*. No sistema nervoso entérico, *Sox10* pode ativar *c-Ret* (por meio da ligação com *Pax3*) ou ainda *Ednrb*. O papel de *Sox10* dependerá do contexto extracelular e dos fatores solúveis atuantes.

1.4.2. Fatores solúveis

Muitos fatores solúveis presentes no microambiente embrionário participam do controle da diferenciação das células da CN. Membros da família FGF são conhecidos por estimularem a proliferação e migração das células da CN, *in vitro* (MURPHY *et al.*, 1994; KUBOTA & ITO, 2000). Estudos também têm demonstrado que o fator Fgf2 estimula a diferenciação para células gliais e condrócitos (PETIOT *et al.*, 2002; IDO & ITO, 2006; GARCEZ *et al.*, 2009). A presença de endotelina3 (Et3), *in vitro*, promove um aumento do número de células, que em sua maioria se diferenciam em melanócitos (LAHAV *et al.*, 1996). O fator de crescimento epidermal (Egf) induz, *in vitro*, a diferenciação das células da CN para neurônios e melanócitos (GARCEZ *et al.*, 2009). Membros da família Bmp estimulam a diferenciação para neurônios enquanto o fator de crescimento glial (Ggf) favorece a formação de células gliais (SHAH & ANDERSON, 1997). *Sonic Hedgehog* (Shh) aumenta o número de progenitores comprometidos com a linhagem mesenquimal e neural (CALLONI *et al.*, 2007). A sinalização endógena de Wnt promove a formação de melanócitos (DORSKY, MOON & RAIBLE, 1998).

Apesar de todas essas informações, os dados que temos sobre fatores solúveis e controle da diferenciação das células da CN ainda são poucos, tendo em vista a existência de um microambiente embrionário extremamente rico. A busca por novos fatores que controlam a diferenciação das células da CN é uma área bastante promissora.

1.5. A PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1

A Proteína induzida por estresse do tipo 1 (STI-1) foi inicialmente descrita em *Saccharomyces cerevisiae* como sendo uma proteína de choque térmico (NICOLET & CRAIG, 1989). Mais tarde identificou-se STI-1 como uma proteína citoplasmática (co-chaperona) pertencente à família das chaperonas Hsp70 e Hsp90 (CHANG & LINDQUIST, 1994; LÄSSLE *et al.*, 1997). Atualmente, sabe-se que STI-1 também pode ser secretada como fator solúvel, sendo capaz de interagir com outras proteínas e apresentar funções semelhantes a alguns fatores de crescimento (LIMA *et al.*, 2007).

A STI-1 é expressa pelas células da crista neural no início da migração e também se observou a expressão dessa proteína em gânglios de raiz dorsal e gânglios simpáticos em desenvolvimento (HAJJ *et al.*, 2009; SCHMITT, 2009). No entanto, ao contrário de outras moléculas

sinalizadoras, como Fgfs e Bmps, os estudos sobre a participação da STI-1 no desenvolvimento embrionário são raros. Trabalhos têm demonstrado uma alta afinidade de STI-1, tanto *in vitro* como *in vivo*, com a proteína príon celular (PrP^c) (LOPES *et al.*, 2005; ZANATA *et al.*, 2002). PrP^c funcionaria como uma espécie de receptor para STI-1, sendo também responsável por sua internalização. STI-1, via ligação com PrP^c, promove a diferenciação neuronal, formação de neuritos e, ainda, a neuroproteção (LOPES *et al.*, 2005).

Resultados do nosso grupo foram os primeiros a demonstrar uma importante função de STI-1 na diferenciação das células da crista neural truncal (SCHMITT, 2009). A quantidade de neurônios obtidos normalmente em sistemas de cultivo de células da CN é relativamente baixa (1-3% da população celular), mesmo em condições indutoras para este fenótipo como o tratamento com Ngf (DOUPE, LANDIS & PATTERSON, 1985). Porém, o tratamento com STI-1 mostrou um aumento de 5 vezes no número de neurônios e de 2 vezes no número de melanócitos em detrimento de células gliais (redução de 4 vezes), quando comparado à condição controle (SCHMITT, 2009). Esses resultados nos levam à questão: quais os mecanismos moleculares associados ao efeito da STI-1 sobre a diferenciação das células da CN?

2. JUSTIFICATIVA

Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostram que STI-1 é expresso nas células da CNT *in vitro* (SCHMITT, 2009) e *in vivo* (dados não publicados). Além disso, o tratamento das células da CNT com STI-1 foi capaz de induzir a diferenciação dessas células para neurônios e melanócitos, em detrimento de células da glia (SCHMITT, 2009). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos no efeito da STI-1 sobre as células da CN são desconhecidos. Assim, os resultados obtidos com esse trabalho permitirão não só um melhor entendimento das funções fisiológicas da proteína STI-1, como também um grande avanço na compreensão dos mecanismos de diferenciação inicial das células da CN.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a influência, *in vitro*, da STI-1 sobre mecanismos moleculares envolvidos com o processo de diferenciação inicial dos progenitores da CNT.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do tratamento com STI-1 sobre a expressão total de Sox10 durante as primeiras 48 horas de cultivo de células da CNT;
- Determinar os níveis de expressão de Sox10 de forma individualizada, nas células da CNT após 48 horas de cultivo, estabelecendo um padrão populacional de expressão de Sox10;
- Verificar o efeito da STI-1 sobre o padrão populacional de expressão de Sox10, de maneira individualizada e agrupada por faixas de expressão (expressão de Sox10 fraca, mediana e forte);
- Verificar a influência de STI-1 sobre a migração/proliferação das células da CNT durante as primeiras 24 horas de cultivo;
- Analisar a influência de STI-1 sobre a proliferação das células da CNT na última hora de cultivo. Assim como, verificar se STI-1 altera as taxas de proliferação celular em algum dos grupos de expressão de Sox10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNA

Ovos de codorna (*Coturnix japonica*) foram adquiridos da Granja Dumuty (localizada na cidade de Rio do Sul, Santa Catarina). Eles foram incubados em posição fixa, com a parte apical voltada para baixo, durante aproximadamente 50 horas em estufa a 38 °C em 65 % de umidade relativa (UR). As técnicas utilizadas neste projeto foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo pp00787.

4.2. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT

Embriões de codorna nos estágios 14 HH e 15 HH (HAMBURGUER & HAMILTON, 1992) (20-22 e 23-24 pares de somitos, respectivamente) foram dissecados. Segmentos da região truncal dos tubos neurais (com aproximadamente 10 somitos) foram retirados e isolados na presença de pancreatina 0,05 % (Sigma Aldrich), com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio e sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). Em média, 3 tubos neurais foram colocados em placa de cultivo celular de 35 mm de diâmetro (Corning) contendo 800 µl de meio α -MEM (α -modified minimum essential medium; Gibco), 10 % de soro fetal bovino (SFB; Cultlab), 2 % de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (Gibco-200 U/ml) e estreptomicina (Gibco-10 µg/ml) (meio de cultivo básico – grupo controle) e outros 3 tubos neurais em placa contendo 800 µl de meio básico suplementado com STI-1 na concentração de 10 ng/ml (grupo STI-1). Após aproximadamente 18 horas, houve adição de 700 µl dos respectivos meios de cultivo (volume final de 1500 µl) (SCHMITT, 2009).

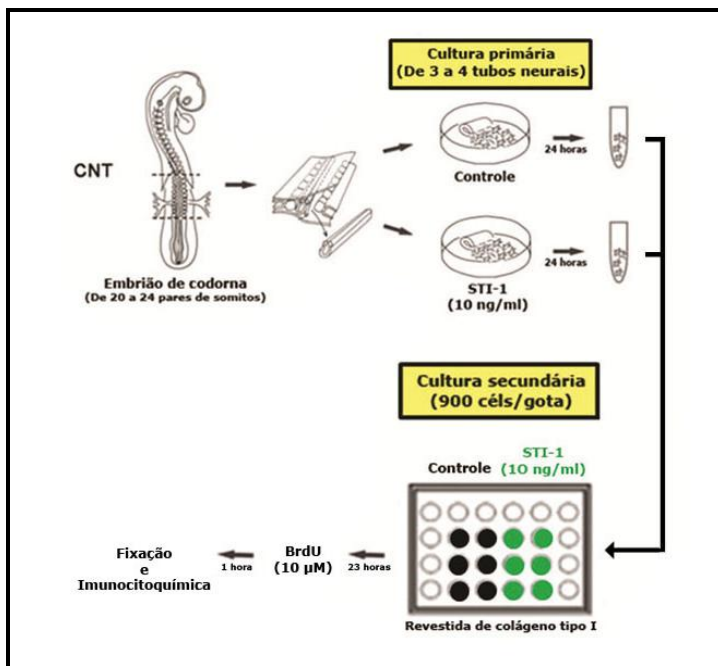
4.3. CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS PARA ANÁLISE DE IMUNOCITOQUÍMICA

Após 24 horas de cultivo (37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de UR), os explantes de tubo neural foram removidos sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). As células que permaneceram aderidas à superfície do recipiente de cultivo correspondem às células migratórias da CNT. Assim, elas foram

deslocadas com solução de Tripsina-EDTA a 0,05 % (Sigma Aldrich), centrifugadas (302g) e resuspensas em meio de cultivo básico. Após contagem em câmara de Neubauer, utilizando o marcador de células não viáveis Tripán Blue (Sigma Aldrich - 0,4 %), 900 células foram replaqueadas em gota de 30 μ l de meio básico (grupo controle) ou meio com STI-1 na concentração de 10 ng/ml (grupo STI-1), sobre placa de 24 poços revestida com colágeno tipo I (concentração de 50 μ g/ml mais 0,02 % de ácido acético em água miliQ). Após uma hora, tempo suficiente para adesão das células, os poços foram recobertos com 365 μ l do respectivo meio (experimento em sextuplicata).

Os cultivos celulares foram mantidos a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂ e 95 % de UR, durante 24 horas. Depois desse período, as células foram fixadas com formaldeído a 2 % (15 minutos, temperatura ambiente), sendo que uma hora antes da fixação das células, foi adicionado 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Invitrogen), para uma concentração final de 10 μ M, ao meio de cada poço. As células foram armazenadas em solução salina de fosfato tamponada (PBS - pH 7,6) para posteriormente serem submetidas às análises de imunocitoquímica (**Figura 6**).

Figura 6- Esquema representativo da metodologia utilizada para a cultura de células da CNT de embrião de codorna.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

Nota: Fragmentos de tubo neural foram isolados de embriões de codorna no estágio de 20 a 24 pares de somitos e colocados em placas de 35 mm contendo meio controle ou meio suplementado com STI-1 (concentração de 10 ng/ml). As células da CNT migraram por 24 horas, sendo em seguida suspensas com auxílio de tripsina 0,05 %. As células foram replaqueadas em placas de 24 poços revestidas com colágeno do tipo I, contendo meio controle ou suplementado com STI-1. Após 23 horas adicionou-se BrdU ao meio de cada poço e então depois de mais 1 hora as células foram fixadas e submetidas a análises de imunocitoquímica.

4.4. IMUNOCITOQUÍMICA

Foi analisada a expressão do fator de transcrição Sox10 (presente em células indiferenciadas da CN) e do perfil de incorporação de BrdU (marcador de proliferação celular), através do método de imunocitoquímica para fluorescência. As células fixadas foram permeabilizadas durante 30 minutos em temperatura ambiente com solução de PBS-Triton X-100 0,5 %. Foram realizadas duas incubações de 15 minutos com HCl 2N, seguida de uma incubação de 10 minutos com Tampão Borato (0,6 % de ácido bórico e 0,6 % de NaOH, em água destilada com pH 8,4), com lavagens com PBS entre elas. Por fim, as células foram incubadas durante 30 minutos com PBS suplementado com 5 % de SBF, para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-Sox10 (Abcam) e anti-BrdU (Abcam), nas concentrações de 1:500 e 1:100 respectivamente, durante toda a noite a 4 °C.

Depois desse período, foram feitas sucessivas lavagens com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (Sigma Aldrich). Subsequentemente as células foram incubadas por 1 hora (temperatura ambiente) com os anticorpos secundários, ambos na concentração de 1:1000, conjugados a fluorocromos específicos (**Tabela 1**). Após sucessivas lavagens com PBS-Tween as células foram incubadas durante 8 minutos com o corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindoldihidroclorido (DAPI) (Sigma Aldrich- 0,1 µg/ml) e então observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71 com câmera Olympus DP71). Foram fotografados aleatoriamente 6 campos de cada placa em ambos os grupos (controle e STI-1). Ao total foram realizados quatro experimentos independentes (n= 4).

Tabela 1-Anticorpos utilizados na análise de imunofluorescência.

Anticorpo primário	Anticorpo secundário
anti-Sox10	anti-IgG GAR Alexa 488 (Invitrogen)
anti-BrdU	anti-IgG1 GAM Alexa 594 (Invitrogen)

Fonte: Produzida pela autora (2015).

4.5. ANÁLISE DE DADOS

4.5.1. Análise da expressão de Sox10

A expressão de Sox10 foi quantificada por meio do programa ImageJ (desenvolvido por *National Institutes of Health*) após 48 horas de cultivo celular (24 horas de cultura primária mais 24 horas de cultura secundária). Cada célula do campo foi selecionada e então foram utilizados os *plugins* “*Analyze*” seguido de “*Measure*” para mensurar a intensidade de fluorescência emitida por cada célula. Os valores de fluorescência obtidos foram relativizados: o menor valor de intensidade de fluorescência obtido em cada experimento (considerando grupo controle e tratado com STI-1) foi igualado a 1 e o maior valor obtido igualado a 100. Desta forma, os valores dos diferentes experimentos (n=4) puderam ser agrupados como um único grupo, formando assim duas populações totais de células, controle e tratada com STI-1. A intensidade de fluorescência obtida por cada célula foi considerada diretamente relacionada aos níveis de expressão de Sox10. Com esses dados foi montado o gráfico da expressão total de Sox10 por células de cada população, assim como gráficos de distribuição populacional.

Por fim, as células das populações foram divididas em três grupos de acordo com a fase da curva de distribuição populacional em que se encontravam (para mais detalhes ver tópico 4.3 dos resultados). Assim, foram criados 3 grupos de intensidade de expressão de Sox10: células fracas, as quais apresentaram intensidade de fluorescência de 1 até 20 UA (Unidade Arbitrária). Células medianas, as quais apresentaram intensidade de fluorescência entre 20 e 80 UA. E por fim células fortes, as quais apresentam intensidade de fluorescência de 80 a 100 UA. As quantidades de células em cada grupo de expressão foram comparadas entre as populações controle e tratada com STI-1 (para essa análise foram considerados os resultados dos 4 experimentos independentes).

4.5.2. Análise de proliferação

Primeiramente, comparamos o número médio de células que migraram /proliferaram a partir dos tubos neurais do grupo controle e tratado com STI-1. Após 24 horas de cultivo, os fragmentos do tubo neural foram removidos, as células da CN resuspendidas com solução de Tripsina-EDTA (ver tópico 4.3 da metodologia) e o número total de células foi quantificado por contagem em câmera de Neubauer.

Dividindo o valor total obtido pelo número de tubos neurais utilizados para cada condição de cultivo, obtemos o valor médio de células da CN que migram/proliferam a partir de cada tubo neural. Esse resultado permitiu-nos avaliar o efeito do tratamento com STI-1 sobre as taxas de proliferação/migração celular durante as primeiras 24 horas de cultivo.

Também foi feita a análise da proporção de células que incorporaram o BrdU na última hora de cultivo celular (lembrando que as células foram cultivadas durante um total de 48 horas), no grupo controle e tratado com STI-1. Além disso, para uma análise mais criteriosa, foi comparada entre o grupo controle e tratado com STI-1 a quantidade de células que incorporaram BrdU em cada um dos grupos de intensidade de expressão de Sox10 criados: fraca, mediana e forte (para essa análise foram considerados os resultados dos 4 experimentos independentes).

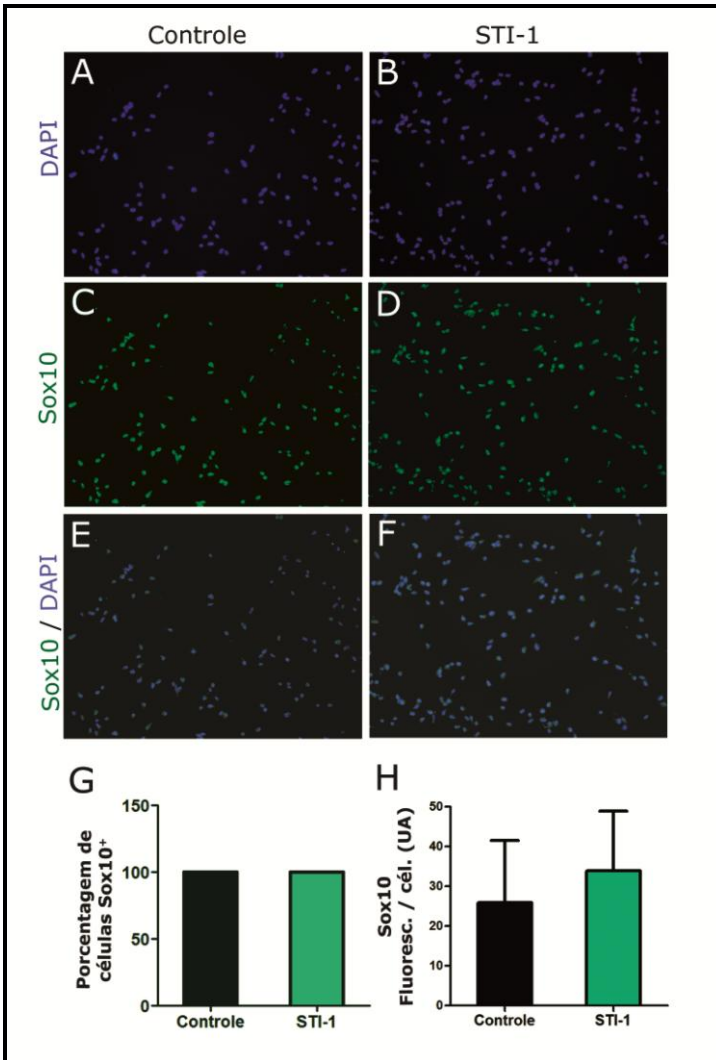
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com a expressão de Sox10 total foram analisados utilizando o teste t de *Student*, assim como os valores de células que migraram/proliferaram por tubo e o número total de células que incorporaram BrdU em cada população. Já para a comparação das curvas de distribuição populacional dos grupos controle e tratado com STI-1, foi utilizado o Teste de Wilcoxon. Por fim, os dados que comparavam os diferentes grupos de intensidade de fluorescência, onde foram considerados os resultados dos 4 experimentos independentes, 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®.

4. RESULTADOS

4.1. STI-1 NÃO ALTERA A EXPRESSÃO TOTAL DE SOX10 EM CÉLULAS DA CNT

O *Sox10* é um dos mais importantes genes expressos pelas células da CN durante o início de sua migração. Podemos observar que 100 % das células, tanto na condição controle como tratada com STI-1, são positivas para Sox10 (**Figura 7 A, B, C, D, E, F e G**). A análise quantitativa da fluorescência total para Sox10, na condição controle e tratado com STI-1, não mostrou diferença significativa entre esses grupos (**Figura 7, H**). Esse tipo de medida nos dá um valor médio por célula da quantidade total de Sox10 em cada condição. Analisando dessa maneira, a STI-1 parece não influenciar na expressão de Sox10. No entanto, nas fases iniciais de diferenciação das células da CNT, Sox10 poderia estar sendo discretamente modulado. Dessa forma, alterações sutis na expressão de Sox10 poderiam ser responsáveis pelos encaminhamentos iniciais do processo de diferenciação das células da CNT.

Figura 7- Efeito de STI-1 sobre a expressão total de Sox10.

Fonte: Produzida pela autora (2015).

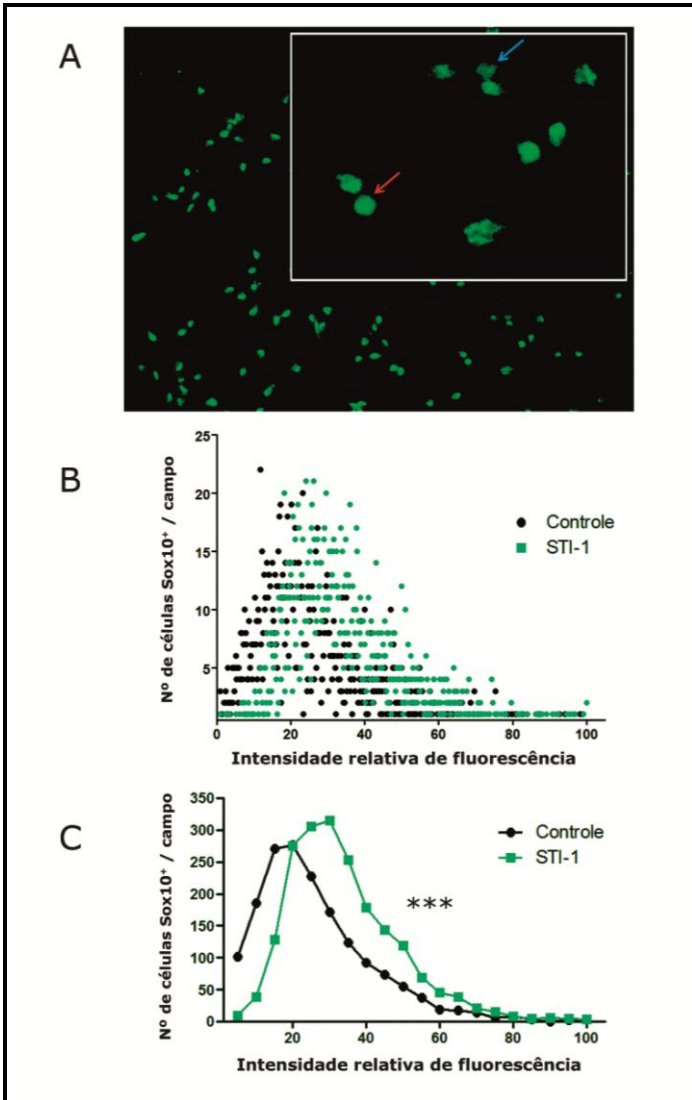
Nota: O número de células totais foi determinado pela marcação nuclear com DAPI (azul) nas células em condição controle (A) e tratadas com STI-1 (B). Imunofluorescência indireta para Sox10 (verde) no controle (C) e STI-1 (D). Sobreposição da marcação para DAPI e Sox10 no controle (E) e tratado com

STI-1 (F). Todas as fotos estão em aumento de 200x. Em G está representado graficamente que todas as células analisadas são positivas para Sox10. A expressão total de Sox10 foi determinada por imunofluorescência, sendo a intensidade de fluorescência considerada diretamente relacionada aos níveis de expressão de Sox10. Assim, o gráfico em H representa a expressão média de Sox10 obtida através da divisão da fluorescência total pelo número total de células em cada campo (controle e tratado com STI-1).

4.2. STI-1 ALTERA O PADRÃO DE EXPRESSÃO DE SOX10 EM CÉLULAS INDIVIDUALIZADAS DA CNT

No experimento anterior verificamos que a STI-1 não foi capaz de promover alterações pronunciadas na expressão de Sox10, sugerindo que a STI-1 poderia estar envolvido num controle mais fino do processo de comprometimento e diferenciação das células da CNT. Além disso, se sabe que as células da CNT são uma população heterogênea e, portanto, elas podem responder de maneira diferenciada a um determinado estímulo. Observando com cuidado as células nas figuras 7 C e D, é possível perceber que há diferença na intensidade da expressão de Sox10 apresentada por cada célula como é mostrado na foto em detalhe na **Figura 8 A**. Desta forma, realizamos uma análise da expressão de Sox10 de maneira individualizada. Os valores obtidos foram plotados em gráfico de distribuição de população (**Figura 8 B**). Observa-se que as duas populações de células (controle e tratada com STI-1) não apresentam a mesma distribuição. Esse dado foi confirmado quando fizemos a curva média das distribuições populacionais (**Figura 8 C**), mostrando que essa diferença entre as populações é significativa. Esses resultados demonstram que o STI-1 é capaz de alterar a expressão de Sox10, no entanto provocando pequenas alterações sobre essa expressão.

Figura 8- Análise da expressão de Sox10 em células individualizadas.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

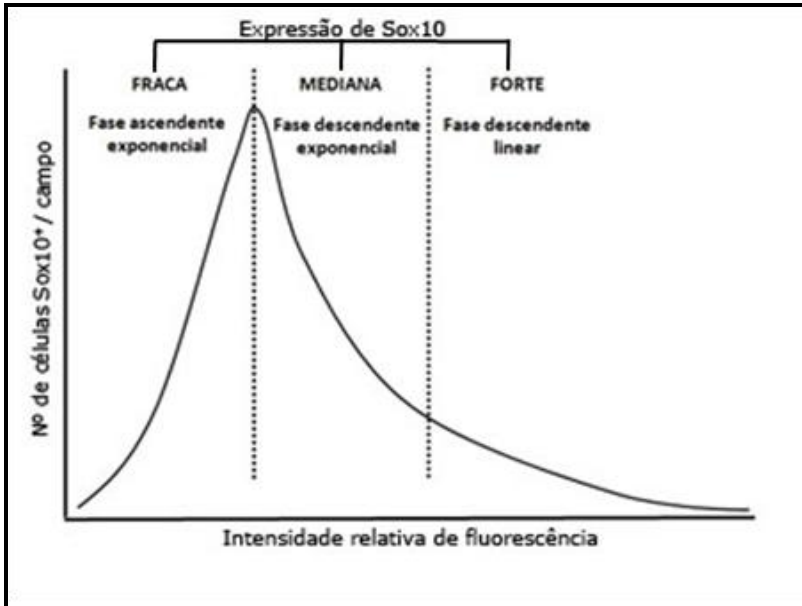
Nota: (A) Detalhe de um campo da foto apresentada na figura 8 C (imunocitoquímica para Sox10 da população controle) mostrando a variação da intensidade da expressão de Sox10 existente entre as células da

população. A seta em azul indica uma célula com expressão mais fraca quando comparada à célula indicada pela seta vermelha. (B) Distribuição de células da população controle (preto) e tratadas com STI-1 (verde). Cada ponto no gráfico representa um grupo de células que apresentam variações de 0,2 UA, na expressão de Sox10. (C) Representação gráfica da linha média da população controle (preto) e tratada com STI-1 (verde). As duas populações são estatisticamente diferentes ($p < 0,001$).

4.3. STI-1 ALTERA DE MANEIRA DIFERENCIAL A EXPRESSÃO DE SOX10 NAS CÉLULAS DA CNT

Analisando os resultados anteriores de expressão de Sox10, em células individualizadas, podemos observar que existe um deslocamento da curva de expressão de Sox10 para a direita, na presença de STI-1 (Figura 8 C). Para quantificarmos de maneira mais precisa essa alteração diferencial na expressão de Sox10, dividimos a população de células da CNT em três grupos de expressão de Sox10 de acordo com a fase da curva de distribuição populacional em que se encontravam: células com expressão fraca, células com expressão mediana e células com expressão forte (**Figura 9**).

Figura 9- Esquema da estratégia utilizada para divisão das células em grupos de expressão de Sox10.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

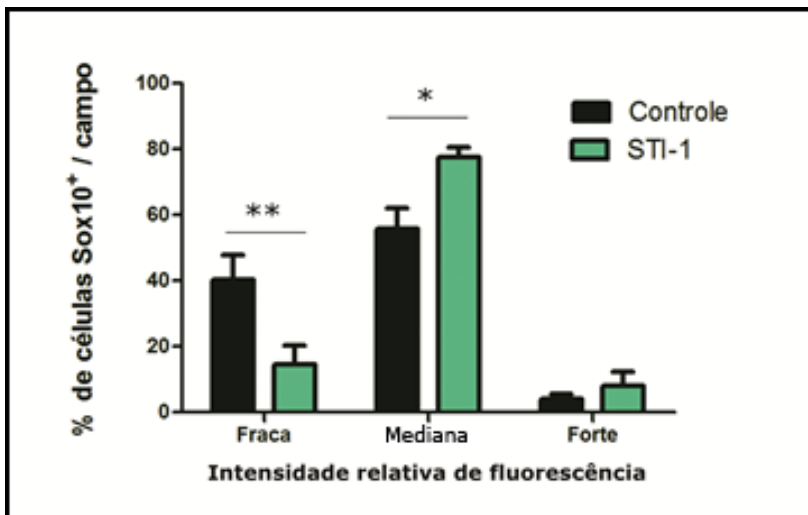
Nota: As células das populações controle e tratada com STI-1 foram divididas em três grupos de expressão de Sox10 de acordo com a fase do gráfico de distribuição populacional em que se encontravam. Células pertencentes à fase ascendente exponencial foram classificadas com uma expressão de Sox10 fraca. Células pertencentes à fase descendente exponencial com expressão de Sox10 mediana. E por fim, as células pertencentes à fase descendente linear foram classificadas com uma expressão de Sox10 forte.

O tratamento com STI-1 reduziu o número de células consideradas com expressão fraca (redução de 64 %), no entanto, aumentou o número de células com expressão mediana (aumento de 28 %). As células com expressão forte de Sox10 não alteraram com o tratamento com STI-1, apesar de demonstrarem certa tendência de aumento (**Figura 10**).

Esse efeito bastante interessante da STI-1 sobre os níveis de expressão de Sox10, nas células da CNT, poderia explicar o porquê de não termos observado diferença na expressão total de Sox10 (Figura 7

H), pois se um grupo de células reduz a expressão e outro sobe, no geral, esse efeito pode se anular.

Figura 10- Efeito do STI-1 na expressão de Sox10 analisada por grupos de expressão.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

Nota: As células da CNT foram divididas em grupos conforme seu nível de expressão de Sox10 (fracas, medianas e fortes). O STI-1 foi capaz de reduzir o número de células que apresentavam expressão de Sox10 fraca e aumentar o número de células que apresentavam expressão mediana de Sox10. Resultados de 4 experimentos individuais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

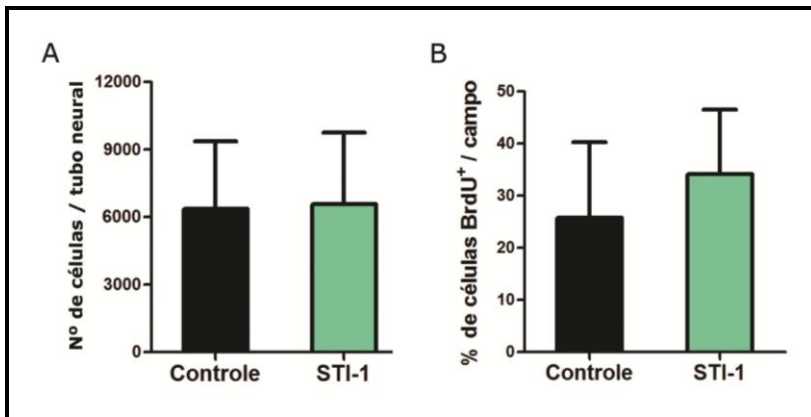
4.4. STI-1 NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO CELULAR TOTAL

Foi realizada a análise da proliferação celular nos grupos tratado com STI-1 e controle, com a finalidade de verificar se o aumento na expressão de Sox10 provocado por STI-1 (observado na figura 10) seria ocasionado por uma alteração na proliferação das células da CNT. Poderíamos supor que o tratamento com STI-1 estaria provocando um aumento na proliferação das células com expressão mediana de Sox10. Ou ainda, que STI-1 estaria diminuindo a proliferação das células com expressão fraca.

Para testar essa hipótese, foram realizados dois ensaios para medir a proliferação celular. No primeiro deles avaliamos diretamente o número total de células que deixam o tubo neural, durante as primeiras 24 horas de cultivo. Nesse período não observamos diferenças no número médio de células que migraram/proliferaram a partir do tubo neural (**Figura 11 A**). Importante lembrar que, durante as primeiras 24 horas de cultivo, as células da CNT migram do tubo neural apresentando altas taxas de proliferação.

No segundo ensaio, foi avaliada a incorporação de BrdU total durante a última hora do cultivo. Não foram observadas diferenças na incorporação de BrdU entre os grupos controle e tratados com STI-1 (**Figura 11 B**). No entanto, esse resultado de proliferação também poderia estar mascarado pela heterogeneidade existente na população de células da CNT. Assim, foram realizadas análises mais criteriosas de proliferação, seguindo a divisão por grupos de expressão de Sox10.

Figura 11- Efeito de STI-1 sobre a proliferação celular total.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

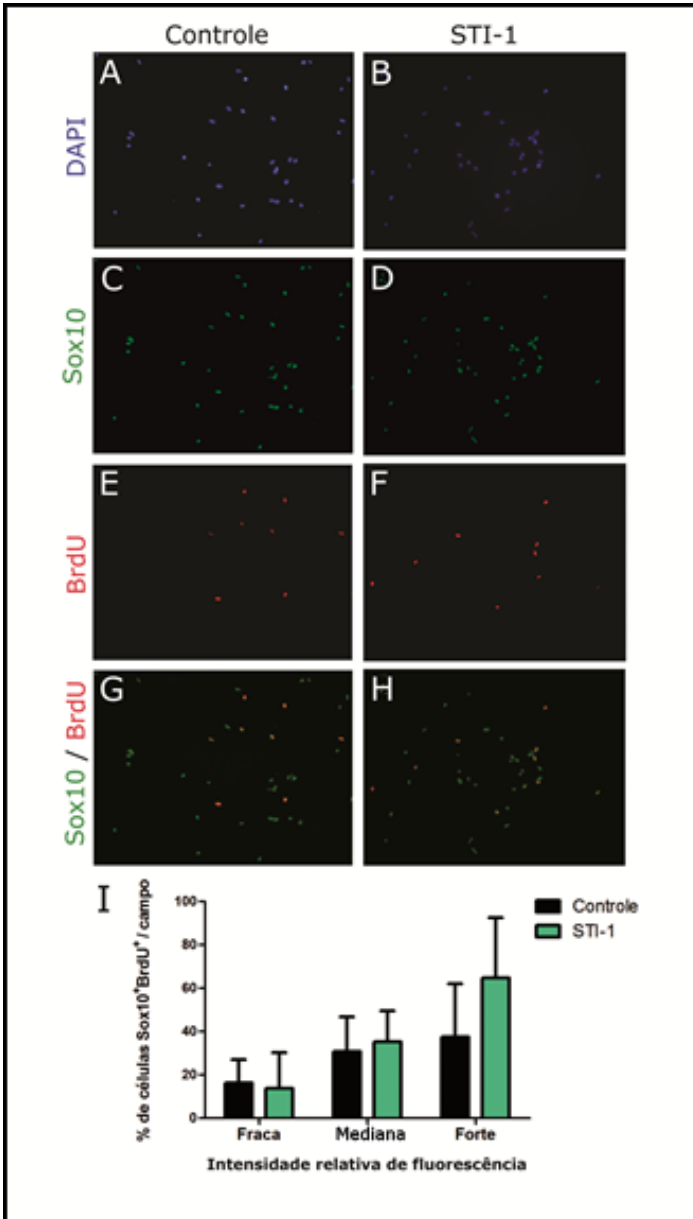
Nota: (A) Número total de células da CN que migraram/proliferaram por tubo neural no grupo controle e tratado com STI-1. As células da CNT migram a partir de tubos neurais isolados e colocados em cultivo, durante 24 horas. (B) Análise da incorporação de BrdU em células da CNT, durante a última hora de cultivo celular do grupo controle e tratado com STI-1. Em ambos os ensaios de proliferação celular não foram observadas diferenças entre os grupos controle e tratado com STI-1.

4.5. STI-1 NÃO ALTERA DE MANEIRA DIFERENCIAL A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS PARA SOX10

Para confirmar se a STI-1 estaria estimulando a proliferação celular em algum dos grupos de expressão de Sox10 em específico, foram quantificadas as células positivas simultaneamente para BrdU e Sox10 (**Figura 12 A, B, C, D, E, F, G, H**). Em seguida foi observado a qual grupo de expressão de Sox10 essas células pertenciam: fracas, medianas ou fortes. Desta forma, foi feita uma análise de proliferação celular separada por grupo de expressão de Sox10. Nessa análise não observamos diferença significativa na proliferação entre o grupo controle e tratado com STI-1, em nenhum dos grupos de expressão de Sox10. No entanto, foi observada uma tendência de aumento na proliferação das células com expressão forte de Sox10, quando tratadas com STI-1 (**Figura 12 I**).

Uma vez que esses resultados indicam que STI-1 não altera a proliferação celular, poderíamos sugerir que STI-1 estimula o aumento da expressão de Sox10 nas células com expressão fraca. Dessa forma, essas células seriam deslocadas de grupo, aumentando o número de células com uma expressão mediana de Sox10 no grupo tratado com STI-1.

Figura 12- Análise de proliferação das células pertencentes aos diferentes grupos de expressão de Sox10.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

Nota: Marcação nuclear com DAPI (azul) nas células em condição controle (A) e tratadas com STI-1 (B). Imunofluorescência indireta para Sox10 (verde) no controle (C) e tratado com STI-1 (D). Marcação nuclear através da incorporação de BrdU na população controle (E) e tratada com STI-1 (F). Sobreposição da marcação para Sox10 e BrdU no controle (G) e tratado com STI-1 (H). Todas as fotos estão em aumento de 200x. (I) Gráfico comparando a taxa de proliferação celular em cada grupo de expressão de Sox10. Não foi observada diferença estatística entre os grupos do controle e tratado com STI-1.

5. DISCUSSÃO

Trabalho anterior do nosso grupo aponta para um importante efeito de STI-1 na diferenciação das células da crista neural, principalmente estimulando a diferenciação neuronal (SCHMITT, 2009). No entanto, os mecanismos moleculares associados a esse efeito são desconhecidos. Assim, neste trabalho foi analisada a influência de STI-1 sobre o fator de transcrição Sox10, considerado um dos principais reguladores envolvidos na escolha inicial do caminho de diferenciação das células da crista neural (AOKI *et al.*, 2003; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). Atualmente não existem trabalhos na literatura relacionando STI-1 e Sox10, portanto realizamos uma série de ensaios afim de melhor compreender essa relações.

A análise da expressão total de Sox10 não mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com STI-1, aparentemente indicando que não há influência de STI-1 sobre a expressão de Sox10. No entanto, é importante ressaltar que as células da crista neural migram como uma população heterogênea, formada por progenitores pluripotentes, oligopotentes e monopotentes (TRENTIN *et al.*, 2004; CALLONI, LE DOUARIN & DUPIN, 2009; BITTENCOURT *et al.*, 2013). Por esse motivo, o nível de expressão de Sox10 não é homogêneo entre as células nos estágios iniciais de migração das células da CN. Sendo assim, para verificarmos com maior precisão possíveis variações na expressão de Sox10, optamos por realizar análises de expressão em células individualizadas.

A análise da distribuição populacional de células da CN, em relação a sua expressão de Sox10, permitiu não só ter uma maior clareza dessa heterogeneidade das células da CN, como também mostrou uma variação na expressão de Sox10 bastante interessante, tanto nas células controle quanto tratadas com STI-1. Além disso, foi possível notarmos um deslocamento significativo da curva da distribuição das células da CN tratadas com STI-1, em direção a níveis de expressão de Sox10 mais elevados. A maioria dos trabalhos que analisam expressão de Sox10 em células da CN faz análises totais, sem levar em consideração a natureza heterogênea dessa população celular (SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). Muito provavelmente, esses trabalhos estão perdendo informações preciosas em relação à participação de Sox10 nas fases iniciais de diferenciação das células da CN.

O aumento sutil na expressão de Sox10 após o tratamento com STI-1, observado somente após uma análise individualizada das células da CN, corrobora com a hipótese de que nas fases iniciais de

diferenciação das células da CNT, os fatores de transcrição são discretamente modulados. Ou seja, são alterações sutis na expressão desses fatores que encaminham os processos iniciais de diferenciação das células da CNT. Essa é uma hipótese cada vez mais aceita por pesquisadores da área. No entanto, existe ainda uma grande dificuldade para se trabalhar com as cadeias regulatórias de genes que controlam as decisões iniciais do processo de diferenciação das células da CN (SIMÕES-COSTA & BRONNER, 2015). Nossos resultados estão entre as primeiras evidências que corroboram essa hipótese.

A divisão das populações de células em três grupos, baseados no nível de expressão de Sox10, evidenciou que o deslocamento da curva de distribuição populacional, do grupo tratado com STI-1, foi causado por um aumento no número de células consideradas com expressão mediana, em detrimento das células com expressão fraca. Importante ressaltar que a divisão entre “forte”, “mediana” e “fraca”, definida neste trabalho, não representa necessariamente uma relação real da expressão de Sox10. Uma expressão definida como “fraca” não indica uma baixa expressão de Sox10 na célula, mas sim que o grupo de células dessa população teve os menores níveis de expressão e assim sucessivamente. Aliás, considerando que estamos trabalhando com progenitores indiferenciados, espera-se que todas as células analisadas apresentem taxas relativamente altas de expressão de Sox10.

Existem duas possibilidades que poderiam explicar o efeito da STI-1 sobre a expressão de Sox10. Na primeira delas, sob tratamento com STI-1, as células com expressão fraca estariam aumentando sua expressão de Sox10 e passando à categoria mediana. Uma segunda possibilidade estaria relacionada à proliferação celular: a STI-1 estaria induzindo a proliferação celular de maneira seletiva, conforme o nível de expressão de Sox10. Ou seja, STI-1 poderia estar aumentando a proliferação das células com expressão mediana de Sox10.

As análises de proliferação total das células da CN tratadas com STI-1, tanto por contagem direta quanto por análise de incorporação de BrdU, não mostraram alterações entre o grupo controle e tratado com STI-1. Numa segunda etapa, foi analisada a proliferação celular de cada grupo de expressão de Sox10. Igualmente, não foram observadas diferenças significativas na incorporação de BrdU entre o grupo controle e tratado com STI-1, em nenhuma das condições. O fato de STI-1 não alterar a proliferação celular, indica que ele estaria atuando diretamente sobre o controle da expressão de Sox10.

Todavia, é possível estabelecer uma correlação direta entre o nível de expressão de Sox10 e a taxa de proliferação: quanto maior a

expressão de Sox10, maior a proliferação celular. Esse resultado está de acordo com as funções já descritas de Sox10 na manutenção e proliferação de células da CN indiferenciadas (KIM *et al.*, 2003; HONORÉ, AYBAR & MAYOR, 2003; MCKEOWN *et al.*, 2005). O maior número de células com níveis mais elevados de Sox10 poderia estar relacionado não apenas com a manutenção dessas células em estado mais indiferenciado, como também estar diretamente relacionado aos passos iniciais do processo de diferenciação dos progenitores com potencialidade para neurônios e melanócitos (LANG & EPSTEIN, 2003; HARRIS *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que células da CNT tratadas com STI-1, durante apenas as primeiras 24 horas de cultivo, apresentam após 6 dias, 5 vezes mais neurônios, 2 vezes mais melanócitos e 4 vezes menos células gliais, quando comparadas às condições controle (SCHMITT, 2009). Analisando esses dados em conjunto com nossos resultados, poderíamos levantar a hipótese que pequenas alterações na expressão de Sox10 poderiam levar a diferentes caminhos de diferenciação. Desta forma, uma expressão mediana de Sox10, por exemplo, seria necessário para induzir a expressão de fatores específicos da via de diferenciação para neurônios e melanócitos, tais como Mash1 e Mitf, respectivamente (LO *et al.*, 1994; HOWARD, 2005, HARRIS *et al.*, 2013). Uma pequena redução na expressão de Sox10 levaria à expressão de fatores específicos da diferenciação glial, tais como Krox20 (KAMHOLZ *et al.*, 1999; JESSEN & MIRSKY, 2002). Em síntese, STI-1 estaria aumentando o número de progenitores envolvidos com a diferenciação para neurônios e melanócitos, os quais apresentariam uma maior expressão de Sox10, e diminuindo o número de progenitores gliais, os quais apresentariam uma expressão de Sox10 um pouco menor. Ensaios de clonagem celular seriam interessantes neste caso, para caracterização dos progenitores formados após o tratamento com STI-1 e, assim, confirmar essa hipótese de atuação do STI-1 sobre a dinâmica de progenitores das células da CN.

Trabalhos publicados sobre a regulação da diferenciação das células da crista neural relatam a importância do fator Sox10 nesse processo (SAUKA-SPLENGER & BRONNER-FRASER, 2008). A supressão da expressão de Sox10 causa defeitos na migração e/ou diferenciação de diversos derivados da crista neural, tais como células gliais, melanócitos e neurônios (SOUTHARD-SMITH, KOS & PAVAN, 1998; INOUE, TANABE, & LUPSKI, 1999; BRITSCH *et al.*, 2001). Estudos comprovam que Sox10 é necessário para a ativação de genes que especificam a diferenciação dessas linhagens (MEULEMANS &

BRONNER-FRASER, 2004; SAUKA-SPENGLER & BRONNER-FRASER, 2008). No entanto, apesar desses trabalhos comentarem sobre altas expressões de Sox10 na regulação desses fenótipos, eles não analisam diferentes níveis de expressão desse fator. É possível que esses autores, por não realizarem uma análise da expressão de Sox10 por célula, estejam perdendo informações importantes. Ao mesmo tempo, torna-se difícil fazer comparações dos nossos resultados com esses trabalhos.

Kim e colaboradores (2003), por exemplo, apontam que a expressão de Sox10 nas células da CN se mantém até certo momento em precursores de glia e neurônio. Porém, as células que seguem para o caminho de diferenciação para neurônios têm a expressão de Sox10 diminuída devido à indução da expressão do fator Mash1, enquanto as células que seguem o caminho glial mantêm essa expressão alta. No entanto, quando analisamos esse dado, percebemos que é observada a regulação de progenitores já comprometidos com uma única linhagem celular. Não se explica o que faz o progenitor multipotente ir para o caminho da diferenciação glial ou neuronal. Por que em algumas células, Sox10 induz a expressão de Mash1 levando à diferenciação neuronal e, em outras, ele ativa outros fatores levando à diferenciação glial? Diferentes níveis de expressão de Sox10 poderiam ser a resposta para essa pergunta.

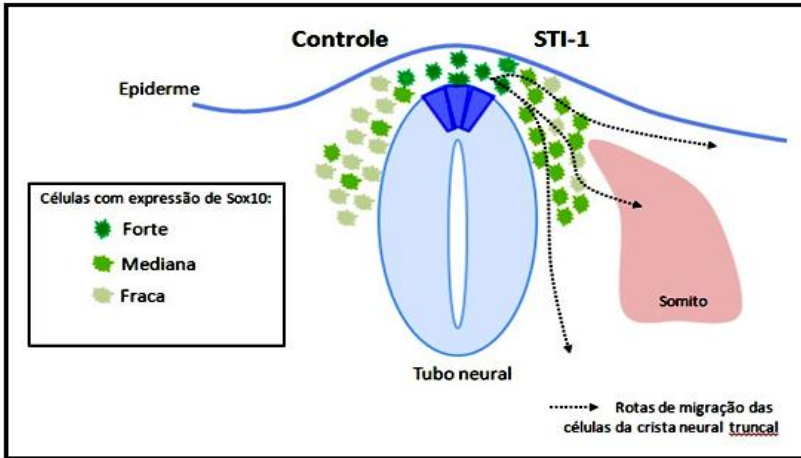
A hipótese levantada por esse trabalho também poderia explicar a propriedade multifuncional que é atribuída à proteína Sox10 no desenvolvimento das linhagens celulares (KIM *et al.*, 2003). Trabalhos apontam uma múltipla função de Sox10, uma vez que se observa a influência desse fator em diversos processos. Essa múltipla ação de Sox10 poderia ser explicada por diferentes níveis de expressão de Sox10, ocasionando diferentes reações na célula. Outro forte indício de que variações na expressão de Sox10 estão relacionadas a diferentes efeitos, são os experimentos mostrando que a supressão de apenas um alelo produtor de Sox10 é suficiente para inibir a expressão do fator Phox2A, enquanto os fatores Mash1 e Phox2B só são inibidos se os dois alelos produtores de Sox10 são deletados (KIM *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados deste trabalho mostrarem que o tratamento com STI-1 provoca um aumento da expressão de Sox10 em relação ao controle, não é possível confrontar esses resultados com a expressão inicial de Sox10, ou seja, não é possível saber se as células deixam o tubo neural com uma expressão de Sox10 “forte”, “mediana” ou “fraca”. Esse dado seria importante para traçar um perfil da expressão de Sox10 ao longo da migração das células da CNT. No

entanto, altos níveis de Sox10 são associados à manutenção de um estado indiferenciado das células da crista neural (MCKEOWN *et al.*, 2005) e, além disso, um estudo recente mostrou que a super-expressão de Sox10 em fibroblastos foi capaz de levar essas células de volta a um estado indiferenciado (KIM *et al.*, 2014). Portanto, há indícios de que Sox10 tem sua expressão máxima nos progenitores mais iniciais indiferenciados, aqueles que deixam o tubo neural. Correlacionando com os resultados deste estudo, essa informação nos leva a crer que as células com uma expressão “forte” representariam os progenitores mais indiferenciados, que possuem uma multipotencialidade bastante ampla. Diminuições da expressão de Sox10 levariam a um maior comprometimento com certas linhagens celulares.

Este trabalho é o primeiro a mostrar que a STI-1 exerce influência na expressão de Sox10 nas células da crista neural truncal, alterando o padrão de expressão desse fator (**Figura 13**). Essa observação só foi possível após uma análise individualizada das células das populações controle e tratada com STI-1, respeitando a heterogeneidade associada às células da CN. Analisar pequenas alterações provocadas na expressão dos fatores de transcrição envolvidos na decisão dos caminhos de diferenciação das células da crista neural, pode ajudar a entender os mecanismos moleculares associados a esse processo.

Figura 13- STI-1 exerce influência na expressão de Sox10 nas células da crista neural truncal.



Fonte: Produzida pela autora (2015).

Nota: O tratamento com STI-1, realizado durante as primeiras 48 horas de cultivo das células da CNT, provoca um aumento no número de células com uma expressão de Sox10 mediana, em detrimento das células com expressão fraca. Esse resultado corrobora a hipótese de que são alterações no nível de expressão de fatores de transcrição que encaminham os processos iniciais de diferenciação das células da CNT.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com STI-1 não altera a expressão total de Sox10 nas fases iniciais de cultivo de células da CNT;
- STI-1 altera o padrão populacional de expressão de Sox10 nas células da CNT individuais;
- O tratamento com STI-1 induz alterações na expressão de Sox10 em grupos distintos, levando a um aumento do número de células consideradas com expressão mediana de Sox10 em detrimento de células com expressão fraca;
- STI-1 não influencia a migração e a proliferação das células da CNT durante as primeiras 24 horas de cultivo;
- STI-1 não altera as taxas de proliferação celular, na última hora de cultivo, independente do nível de expressão de Sox10.

7. PERSPECTIVAS

Além de Sox10, alguns outros fatores de transcrição também são considerados bastante importantes na regulação da decisão dos caminhos de diferenciação das células da crista neural. Entre eles, destaca-se a participação de FoxD3 e Pax3. Desta forma, como continuação deste trabalho, pretende-se analisar a influência de STI-1 na expressão desses fatores. A partir dos resultados obtidos, iremos buscar marcadores específicos de um fenótipo derivado da crista neural. Possíveis genes candidatos são Mash1 (marcador de progenitores neuronais) e Krox2 (marcador de progenitores gliais). Esses resultados nos ajudarão a entender o papel de STI-1 sobre os mecanismos moleculares associados à diferenciação da crista neural.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, J. M. C. **Mesenchymal potentials of the trunk neural crest cells**. 2012. 261 f. Tese de doutorado- Université Paris Sud, Paris, 2012.

AKITAYA, T. & BRONNER-FRASER, M. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. **Developmental Dynamics**, v. 194, n. 1, p. 12-20, 1992.

AOKI, Y.; SAINT-GERMAIN, N.; GYDA, M.; MAGNER-FINK, E.; LEE, Y.-H.; CREDIDIO, C. & SAINT-JEANNET, J. P. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. **Developmental Biology**, v. 259, n. 1, p. 19 -33, 2003.

BASCH, M. L.; BRONNER-FRASER, M. & GARCIA-CASTRO, M. I. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and require Pax7. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 218-222, 2006.

BELLMAYER, A.; KRASE, J.; LINDGREN, J. & LABONNE, C. The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in *xenopus*. **Developmental Cell**, v. 4, n. 6, p. 827–839, 2003.

BITTENCOURT, D. A.; COSTA, M. C.; CALLONI, G. W.; ALVAREZ-SILVA, M. & TRENTIN, A. G. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes the Self-Renewal of Bipotent Glial Smooth Muscle Neural Crest Progenitors. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 8, p. 1241-1251, 2013.

BRITSCH, S.; GOERICH, D. E.; RIETHMACHER, D.; PEIRANO, R. I.; ROSSNER, M.; NAVE, K. A.; BIRCHMEIER, C. & WEGNER, M. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. **Genes Development**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2001.

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.

CALLONI, G. W.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M. & DUPIN, E. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal

and neural potentials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19879-19884, 2007.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. & DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 8947-8952, 2009.

CHANG, H. C. & LINDQUIST, S. Conservation of Hsp90 macromolecular complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24983-24988, 1994.

CHEUNG, M.; CHABOISSIER, M. C.; MYNETT, A.; HIRST, E.; SCHEDL, A. & BRISCOE, J. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. **Developmental Cell**, v. 8, n.2, p. 179-192, 2005.

DEL BARRIO, M. G. & NIETO, M. A. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. **Development**, v. 129, n. 7, p.1583-1593, 2002.

DORSKY, R. I.; MOON, R. T. & RAIBLE, D. W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. **Nature**, v. 396, n. 6709, p. 370- 373, 1998.

DOUPE, A. J.; LANDIS, S. C. & PATTERSON, P. H. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 8, p. 2119-2142, 1985.

DUBAND, J. L.; MONIER, F.; DELANNET, M. & NEWGREEN, D. Epithelium-Mesenchyme Transition during Neural Crest Development. **Cells Tissues Organs**, v. 154, n. 1, 1995.

DUPIN, E.; CALLONI, G. W. & LEDOUARIN, N. M. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. **Cell Cycle**, v. 9, n. 2, p. 238-249, 2010.

FUKATA, M. & KAIBUCHI, K. Rho-family GTPases in cad herin-mediated cell-cell adhesion. **Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 887–897, 2001.

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

GARCEZ, R. C.; TEIXEIRA, B. L.; SCHMITT, S. S.; ALVAREZ-SILVA, M. & TRENTIN, A. G. 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. 1087–91, 2009.

GARCIA-CASTRO, M. I.; MARCELLE, C. & BRONNER-FRASER, M. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 848–851, 2002.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 10ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2014.

HAJJ, G. N.; SANTOS, T. G.; COOK, Z. S. & MARTINS, V. R. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, n. 3, p. 371–84, 2009.

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

HALL, B. K. **The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution**. New York, EUA: Springer, 2009.

HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. **Developmental Dynamics**, v. 195, n. 4, p. 231–72, 1992.

HARRIS, M. L.; BUAC, K.; SHAKHOVA, O.; HAKAMI, R. M.; WEGNER, M.; SOMMER, L. & PAVAN, W. J. A dual role for SOX10 in the maintenance of the postnatal melanocyte lineage and the differentiation of melanocyte stem cell progenitors. **Plos Genetics**, v. 9, n. 7, 2013.

HONORÉ, S. M.; AYBAR, M. J. & MAYOR, R. Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. **Developmental Biology**, v. 260, n. 1, p. 79–96, 2003.

HOWARD, M. J. Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons. **Developmental Biology**, v. 277, n. 2, p. 271–286, 2005.

IDO, A. & ITO, K. Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 2, p. 361–667, 2006.

INOUE, K.; TANABE, Y. & LUPSKI, J. R. Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation. **Annals of Neurology**, v. 46, n. 3, p. 313–318, 1999.

JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. Signals that determine Schwann cell identity. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 4, p. 367–376, 2002.

KAMHOLZ, J.; AWATRAMANI, R.; MENICHELLA, D.; JIANG, H.; XU, W. & SHY, M. Regulation of myelin-specific gene expression: relevance to CMT1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 883, p. 91–108, 1999.

KIM, J.; LO, L.; DORMAND, E. & ANDERSON, D. J. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. **Neuron**, v. 38, n.1, p. 17–31, 2003.

KIM, Y. J.; LIM, H.; LI, Z.; OH, Y.; KOVLYAGINA, I.; CHOI, I. Y.; DONG, X. & LEE, G. Generation of Multipotent Induced Neural Crest by Direct Reprogramming of Human Postnatal Fibroblasts with a Single Transcription Factor. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 4, p. 497–506, 2014.

KUBOTA, Y. & ITO, K. Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. **Developmental Dynamics**, v. 217, n. 2, p. 170–179, 2000.

LABONNE, C. & BRONNER-FRASER, M. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. **Developmental Biology**, v. 221 n. 1, p. 195–205, 2000.

LAHAV, R.; ZILLER, C.; DUPIN, E. & LE DOUARIN, N. M. 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, 1996.

LANG, D. & EPSTEIN, J. A. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 8, p. 937–945, 2003.

LÄSSLE, M.; BLATCH, G. L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T. & ZETTER, B. R. Stressinducible, murine protein mSTII. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1876–84, 1997.

LE DOUARIN, N. M. & KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G. & DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637–4650, 2004.

LIMA, F. R.; ARANTES, C. P.; MURAS, A. G.; NOMIZO, R.; BRENTANI, R. R. & MARTINS, V. R. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6; p. 2164–2176, 2007.

LIU, J. & JESSELL, T. M. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. **Development**, v. 125, n. 24, p. 5055–5067, 1998.

LO, L.; GUILLEMOT, F.; JOYNER, A. L. & ANDERSON, D. J. MASH-1: a marker and a mutation for mammalian neural crest development. **Developmental Neurobiology**, v. 2, n. 2, p. 191–201, 1994.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R. M.; RIBEIRO, K. C.; BRENTANI, R. R.; LINDEN, R. & MARTINS, V. R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct

signaling pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11330-11339, 2005.

LUO, T.; LEE, Y. H.; SAINT-JEANNET, J. P. & SARGENT, T. D. Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 532–537, 2003.

MARCHANT, L.; LINKER, C.; RUIZ, P.; GUERRERO, N. & MAYOR, R. 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.

MARTINSEN, B. J. & BRONNER-FRASER, M. Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. **Science**, v. 281, n. 5379, p. 988–991, 1998.

MCGONNELL, I. & GRAHAM, A. Trunk neural crest has skeletogenic potential. **Current Biology**, v. 12, n. 9, p. 767- 771, 2002.

MCKEOWN, S. J.; LEE, V. M.; BRONNER-FRASER, M.; NEWGREEN, D. F. & FARLIE, P. G. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 2, p. 430–444, 2005.

MEULEMANS, D. & BRONNER-FRASER, M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. **Developmental Cell**, v. 7, n. 3, p. 291–9, 2004.

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. 3111–3124, 2003.

MURPHY, M.; REID, K.; FORD, M.; FURNESS J. B. & BARTLETT, P. F. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. **Development**, v. 120, n. 12, p. 3519-3528, 1994.

NICOLET, C. M. & CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3638–3646, 1989.

PETIOT, A.; FERRETTI, P.; COPP, A. J. & CHAN, C. T. Induction of chondrogenesis in neural crest cells by mutant fibroblast growth factor receptors. **Developmental Dynamics**, v. 224, n. 2, p. 210-221, 2002.

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W. & KEYNES, R. J. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 90, p. 437-455, 1985.

ROSS, A. P. & ZARBALIS, K. S. The emerging roles of ribosome biogenesis in craniofacial development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 26, 2014.

RUGGERI, P.; FARINA, A. R.; CAPPABIANCA, L.; IANNI, N. D.; RAGONE, M.; MEROLLE, S.; GULINO, A. & MACRAY, A. R. Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. In: SHIMADA, H. (Ed.). **Neuroblastoma**. InTech, 2013. p. 47- 108.

RUHRBERG, C. & SCHWARZ, Q. In the beginning: Generating neural crest cell diversity. **Cell Adhesion & Migration**, v. 4, n. 4, p. 622-630, 2010.

SASAI, N.; MIZUSEKI, K. & SASAI, Y. Requirement of FoxD3- class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. **Development**, v. 128, n. 13, p. 2525–2536, 2001.

SAUKA-SPENGLER, T. & BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 557-568, 2008.

SCHMITT, S. S. **Análise da influência da proteína príon celular (PrPc) e de seu ligante, a proteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1), na diferenciação das células-tronco da crista neural truncal, *in vitro***. 2009. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharel em

ciências biológicas)- Universidade Fedetal de Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2009.

SHAH, N. M. &ANDERSON, D. J. Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11369–74, 1997.

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

SPOKONY, R. F.; AOKI, Y.; SAINT-GERMAIN, N.; MAGNER-FINK, E. & SAINT-JEANNET, J. P. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. **Development**, v. 129, n. 2, p. 421–432, 2002.

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

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, 1987.

TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. San Diego, EUA: Elsevier, 2014.

TRAINOR, P. A. Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 6, p. 683–693, 2005.

TRENTIN, A.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M. &DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4495–4500, 2004.

ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N.; CHIARINI, L. B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A. R.; CABRAL, A. L.; LEE, K. S.; JULIANO, M. A.; OLIVEIRA, E.; JACHERI, S. G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R. R. & MARTINS, V. R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, n. 21, p. 3307-3316, 2002.