

**CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI-MACHADO**

**CARACTERIZAÇÃO DE MELANÓCITOS DERMAIS EM EMBRIÕES DA  
GALINHA SEDOSA JAPONESA E ANÁLISE DE ETAPAS DE SUA  
DIFERENCIAÇÃO.**

**CURITIBA  
2006**

**CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI-MACHADO**

**CARACTERIZAÇÃO DE MELANÓCITOS DERMAIS EM EMBRIÕES DA GALINHA  
SEDOSA JAPONESA E ANÁLISE DE ETAPAS DE SUA DIFERENCIAÇÃO.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cloris Ditzel Faraco

**CURITIBA  
2006**

Dedico esta tese:

Aos meus pais

Roberto e Maria Lúcia

pelo imenso amor e apoio em cada momento de minha vida.

Ao Hilário,

meu marido e amigo,

que em todos os instantes desta experiência

compartilhou e enriqueceu com seu amor, apoio e compreensão

tornando os momentos mais difíceis um caminho menos árduo,

alegre, simples e verdadeiro.

Obrigada por participar do meu projeto de vida.

À Fernanda,

tesouro amado de minha vida,

peço desculpas pelos momentos roubados em nome  
da Ciência.

Obrigada por me dar tanto amor, por ser uma filha

tão especial e por entender, mesmo tão pequena,

minha ausência durante este período.

À minha avó Julieta (*in memoriam*)

por me ter ensinado a lutar e ter fé.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cloris Ditzel Faraco, pelo exemplo de espírito científico, entusiasmo, dedicação, amizade e motivação para minha formação. Seu exemplo sempre procurarei seguir.

À minha família pela paciência, incentivo e compreensão, que me permitiram a realização deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Cris, Paty e Marisa, pela amizade e companheirismo, pela ajuda constante em várias etapas destes 4 anos. Obrigada por terem compartilhado comigo momentos de reflexão e estudo, pelo apoio e carinho nos momentos mais difíceis, e por terem em cada experimento depositado alegria, otimismo e dedicação. Não me abandonem nunca.

A todos os alunos estagiários (Adri, Cheila, Márcia, Fran, Gi,....) que passaram pelo laboratório e que nos ajudaram em várias etapas deste trabalho.

Às monitoras da Nutrição, por me auxiliarem sempre.

Aos amigos do Departamento de Biologia Celular, pela confiança e incentivo. Agradecimento especial ao Ricardo e Cláudio pelo apoio com as aulas nesta etapa final; não sei se conseguiria sem vocês. Carla, obrigada pelo empréstimo do microscópio e câmara digital num momento de desespero.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, Gerizalda, Ana, Nino, Eliana e D.Rozalina, pelo carinho, amizade e constante ajuda.

Ao Laboratório de Patologia Experimental, PUCPR, pelo uso do programa de captação Image Pro Plus.

A todos os colegas do Programa, pela convivência.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à Marlene, sempre tão eficiente e prestativa.

À coordenação do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e em especial a seus funcionários, Regina, Matilde, Rosângela e Sérgio, pelos momentos compartilhados nas inúmeras horas que passei no microscópio eletrônico.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos ensinamentos e convivência.

À Maria Célia Jamur, por me ter iniciado no mundo da pesquisa, e por, juntamente com a Connie, serem exemplos de sabedoria e humildade, sempre dispostas a aconselhar e apoiar.

À minha amiga Ana Cristina Grodzki, que apesar da distância conseguiu me ajudar, mandando as referências urgentes que só se conseguia nos USA.

Aos familiares e amigos que deixei de “lado” nestes 4 anos. Logo, logo, estarei de volta ao convívio de todos.

Minha gratidão a todas as pessoas que me acompanharam neste período e que de muitas formas contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 EMBRIÃO DE AVE: MODELO PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO .....	1
1.2 CRISTA NEURAL .....	2
1.3 O DESENVOLVIMENTO DA LINHAGEM MELANOCÍTICA DERIVADA DA CRISTA NEURAL .....	3
1.4 MELANOGÊNESE .....	6
1.5 PELE DA AVE .....	7
1.6 GALINHA SEDOSA JAPONESA .....	10
1.7 OBJETIVOS .....	11
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 2 – SPECIAL FEATURES OF DERMAL</b> .....	17
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	19
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	21
2.1 EMBRYOS .....	21
2.2 LIGHT MICROSCOPY .....	21
2.3 ELECTRON MICROSCOPY .....	21
2.4 ACID PHOSPHATASE CYTOCHEMISTRY .....	22
2.5 DETECTION OF MELANOBLASTS AND MELANOCYTES IN MATURATION .....	22
<b>3. RESULTS</b> .....	23
3.1 MELANOBLASTS FINAL MIGRATORY PATHWAY .....	23
3.2 DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF DERMAL MELANOCYTES .....	24
3.3 RELATIONSHIP BETWEEN MELANOCYTES AND FIBERS .....	25

3.4 MELANOCYTES AND OTHER CELLS OF THE DERMIS .....	25
<b>4. DISCUSSION</b> .....	36
4.1 DERMAL MELANOCYTES .....	36
4.2 TERMINAL MIGRATION OF MELANOBLASTS .....	37
4.3 MELANOCYTE DIFFERENTIATION IN THE DERMIS IS A CONTINUOUS PROCESS IN SK EMBRYOS.....	38
4.4 RELATIONSHIP BETWEEN MELANOCYTES AND OTHER CELLS OF THE DERMIS .....	42
4.5 POSSIBLE FUNCTIONS OF DERMAL MELANOCYTES .....	43
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	44
<b>LITERATURE CITED</b> .....	45
<b>CAPÍTULO 3 – ETAPAS DA MELANOGÊNESE EM MELANÓCITOS.....</b>	52
<b>RESUMO</b> .....	53
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
2.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES .....	56
2.2 MICROSCOPIA DE LUZ .....	56
2.3 HISTOQUÍMICA .....	56
2.4 IMUNOCITOQUÍMICA .....	57
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	57
2.6 CITOQUÍMICA PARA FOSFATASE ÁCIDA .....	58
<b>3. RESULTADOS</b> .....	59
3.1 CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DOS MELANÓCITOS .....	59
3.2 PASSOS DA MELANOGÊNESE .....	60
3.3 DESTINO DOS MELANOSSOMAS .....	61
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	71
4.1 MELANOGÊNESE .....	72
4.2 DESTINO DOS MELANOSSOMAS .....	74
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1.</b> ....	28
Distribution of Silky (SK) and White Leghorn (WL) SI-positive cells.....	
(A - D) SK embryos.	
(E - G) WL embryos.	
<b>Figure 2.</b> ....	29
(A) 16-days Silky and Leghorn embryos.	
(B) Piece of 19-days SK dorsal skin with characteristic black color .....	
(C) Feather of 16-days SK embryo.	
<b>Figure 3.</b> ....	30
Dermis of Silky embryos prepared by distension method.	
(A-E) Observe the increase of melanocytes number during the various ...	
(F) 16 days: round melanocyte is seen among elongated and dendritic ...	
(G) 19 days: melanocytes are seen around blood vessel.	
(H) 14 days: melanocytes with long cytoplasmic processes ...	
<b>Figure 4.</b> ....	31
HE stained sections of skin of Silky embryo.	
(A) Round melanocytes are seen in the deeper dermis.	
(A-B) Pigment cells just below the fibers region are elongated .....	
(C-D) Mitosis of melanocytes in maturation with few melanin granules.	
<b>Figure 5.</b> ....	32
Relationship between melanocytes and fibers.	
(A-D) Observe the increased deposition of fibers in superficial dermis .....	
<b>Figure 6.</b> ....	33
Dermal skin of Silky embryos.	
(A) Exocytosis of melanosome.	
(B) Melanocyte is seen in close proximity to macrophage.	
(C) Melanosomes lying free in the connective tissue matrix.	
(D, F) Macrophage is enclosing a piece of melanocyte.	
(E) Macrophage containing melanin granules.	



(G) Macrophage with phagocytic vacuole containing debris of melanocyte.	
<b>Figure 7.</b> ....	34
Dermal skin of 18-days Silky embryos.	
(A) Electronmicrograph of a mast cell close to a melanocyte.	
(B) Toluidine blue stained section showing mast cells	
(C) Electronmicrograph showing mast cell and melanocyte close to a .....	
<b>Figure 8.</b> ....	35
Schematics summarizing the described results.	
A) Skin of 6-days Silky embryos.	
B) 14 days.	
C) 19 days.	
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Figura 1.</b> ....	63
(a) Embrião de Sedosa Japonesa (SK) com 19 dias de incubação.	
(b) Corte da região dorsal da pele de embrião de SK.	
<b>Figura 2.</b> ....	64
Eletromicrografias de melanócitos dermais de embrião de Sedosa Japonesa.	
a) Melanócito em estágio inicial de maturação.	
b) Detalhe do Complexo de Golgi no melanócito em maturação.	
c) Todos os estágios de desenvolvimento do grânulo de melanina .....	
d) Corte do prolongamento de um melanócito dermal, contendo melanossomas.	
<b>Figura 3.</b> ....	65
Eletromicrografias de melanócitos em maturação, processados com L-DOPA.	
a) Marcação positiva no corpo celular.	
b) No início do prolongamento.	
c) No prolongamento citoplasmático do melanócito.	
d) Detalhe da marcação para DOPA.	
<b>Figura 4.</b> ....	66
Eletromicrografias de melanócitos em maturação.	
a) Grandes vesículas, contendo estruturas pouco organizadas ou esféricas.	
b) Melanossoma alongado, no estágio I, em fase mais adiantada.	

<b>Figura 5.</b> ....	67
Ultraestrutura dos melanossomas em diferentes estágios de maturação.	
a) Melanossomas nos estágios II e IV.	
b) Melanossomas alongados, no estágio III, com deposição de melanina.....	
c) Corte oblíquo do melanossoma no estágio III.	
d) Melanócito repleto de melanossomas no estágio IV.	
<b>Figura 6.</b> ....	68
Ultraestrutura dos melanossomas no estágio III	
a) Corpo celular do melanócito repleto de melanossomas.	
b) Detalhe do melanossoma.	
c) Melanócito em maturação imunomarcado pelo soro Smyth line (SI).	
<b>Figura 7.</b> ....	69
Modelo representativo das etapas da formação dos grânulos de melanina.	
<b>Figura 8.</b> ....	70
Derme do embrião de Sedosa Japonesa.	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcPase	fosfatase ácida
BSA	soro fetal bovino
CG	complexo de Golgi
<i>c-kit</i>	receptor tirosina-quinase
Dct	dopacroma tautomerase
DHICA	melanina monomérica
FGF	fator de crescimento do fibroblasto
gene <i>p</i>	<i>pink-eyed dilution</i>
HE	hematoxilina - eosina
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
Mlph	melanofilina
NGF, BDNF ou NT-3	neurotrofina
OsO <sub>4</sub>	tetróxido de ósmio
PBS	salina tamponada com fosfato
Pmel17 ou gp100	proteína <i>silver locus</i>
RE	retículo endoplasmático
REL	retículo endoplasmático liso
SCF	<i>stem cell factor ou steel factor</i>
SK	galinha Sedosa Japonesa
SI	soro Smyth-line
TGN	rede <i>trans</i> do Golgi
TRP	proteínas relacionadas à tirosinase
Tyr	tirosinase
UV	luz ultravioleta
WL	galinha White Leghorn

## RESUMO

As galinhas da raça Sedosa Japonesa (SK) são mutantes naturais que apresentam, diferentemente de outras linhagens, uma extensa pigmentação dérmica e visceral. Neste trabalho foram analisadas a morfologia e distribuição da linhagem melanocítica localizada na pele da região dorsal do embrião, em vários estágios de desenvolvimento, na tentativa de entender o papel destas células permanentemente ectópicas na derme. Nossos resultados mostram que melanoblastos e melanócitos imaturos são encontrados até os 19 dias de incubação, sendo alguns proliferativos. A diferenciação do melanócito ocorre na derme e sua forma varia dependendo da localização. Melanócitos maduros, com longos prolongamentos citoplasmáticos formam uma densa malha abaixo da espessa camada de fibras elásticas e colágenas sub-epidermais. Caracterizamos, ultraestruturalmente, as células da linhagem melanocítica descrevendo nelas o processo de melanogênese. Os melanossomas passam por 4 estágios de amadurecimento (estágio I ao IV) que ocorrem tanto no corpo celular quanto nos prolongamentos citoplasmáticos. Apesar da proximidade dos melanócitos com outras células presentes na derme não foi evidenciada a transferência de melanossomas entre eles. Nossos resultados sugerem que o embrião da SK pode ser considerado um rico modelo para o estudo da linhagem melanocítica em seus vários aspectos, incluindo a melanogênese.

## ABSTRACT

The Japanese Silky chicken (SK) is a natural mutant that shows, differently of other lineages, extensive pigmentation in the dermis and connective tissue of internal organs. In this work we analyzed the morphology and distribution of melanocytic lineage cells located in the dorsal skin of the embryo, at various stages of development, in an attempt to understand the role of these permanently ectopic pigment cells in the dermis. Our results show that melanoblasts and immature melanocytes are found until 19-days of incubation, and that some of them are in a proliferative state. The differentiation of melanocytes occurs in the dermis and their form varies, according to the localization. Mature melanocytes with many long cytoplasmic processes form a meshwork in superficial dermis, below a thick layer of elastic and collagen fibers. We characterized ultrastructurally the melanocytic lineage cells and described their melanogenic process. Melanosomes undergo four stages of maturation (I to IV). The melanogenesis happens in the cellular body and cytoplasmic processes as well. Although melanocytes are very close to other cells in the dermis, no transfer of melanosomes was evidenced. Our results show that the Silky embryo can be considered a rich model for the study of the melanocytic lineage in its several aspects, including melanogenesis.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### 1.1 EMBRIÃO DE AVE: MODELO PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

O embrião de ave é considerado um excelente modelo para o estudo da biologia do desenvolvimento. Apresenta semelhanças com os embriões de mamíferos na sua complexidade morfológica e no seu desenvolvimento geral (WOLPERT et al., 2000), porém há maior facilidade de obtenção e de estudo, uma vez que seu desenvolvimento ocorre externamente ao corpo da mãe. Assim, pode-se observar e manipular os embriões abrindo o ovo, além de cultivá-los fora dele. Esta facilidade de manipulação é conveniente quando são feitas técnicas cirúrgicas experimentais e para a observação dos efeitos de compostos químicos.

O embrião de ave é acessível a experimentos durante todo o desenvolvimento embrionário, desde que sejam tomados os cuidados essenciais diários de temperatura, umidade e viragem dos ovos. Este acesso permite a construção no ovo, de quimeras neurais embrionárias, usando o sistema marcador codorna-galinha (LE DOUARIN, 1973). As células da galinha (*Gallus gallus*) e codorna Japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) podem ser diferenciadas pois o núcleo interfásico da codorna mostra uma condensação heterocromática bem característica associada ao nucléolo, que está ausente no núcleo da galinha. Conseqüentemente, as células da codorna e galinha podem ser monitoradas na quimera, na qual regiões definidas do embrião de galinha são recolocadas *in ovo* por seu correspondente da codorna (ou vice-versa). Nestes experimentos, as células das duas espécies podem ser identificadas utilizando-se corantes específicos para o DNA nos cortes dos tecidos da quimera (LE DOUARIN e KALCHEIM, 1999). Com este tipo de experimento foi definido o destino de grande parte das células originadas da crista neural.

## 1.2 CRISTA NEURAL.

A crista neural dos vertebrados se forma durante a neurulação, quando a placa neural se espessa e invagina para formar o tubo neural. Inicialmente, o tubo neural é parte da ectoderme, porém separa-se dela depois de sua formação graças a mudanças na adesividade celular. Desta forma o tubo neural se aprofunda sob a superfície e a ectoderme restante se reconstitui sobre ele formando uma camada contínua (GILBERT, 1997). Quando o tubo neural se fecha, as células da crista neural sofrem uma transição de epiteliais para mesenquimais, sendo o gene *slug* o responsável pelo controle do processo pelo qual células epiteliais que não são móveis tornam-se migratórias (NIETO et al., 1994). O tubo neural dá origem ao sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal). As células da crista neural migram para longe do tubo neural dando origem a diversos tipos celulares, como neurônios, células endócrinas, células de Schwann, células gliais e melanócitos (LE DOUARIN, 1982).

O padrão de migração e os tipos celulares originados da crista neural variam de acordo com o nível axial de sua origem no tubo neural. Assim, as populações de células ao longo do comprimento rostrocaudal do eixo neural são denominadas de cefálica, vagal, do tronco e sacral (LE DOUARIN e KALCHEIM, 1999). Na região do tronco, a migração de células da crista neural segue dois caminhos, um ventral e outro dorsolateral. Em aves, aos dois dias e meio de desenvolvimento do embrião, células migram pela via ventral, entre o tubo neural e somitos, originando células gliais e neurônios do Sistema Nervoso Periférico, além de células secretoras da medula adrenal (LE DOUARIN, 1982). A segunda via de migração, denominada dorsolateral, inicia-se 24 horas depois, quando a migração ventral termina, seguindo entre somitos e ectoderme e dando origem a melanócitos (ERICKSON e GOINS, 1995).



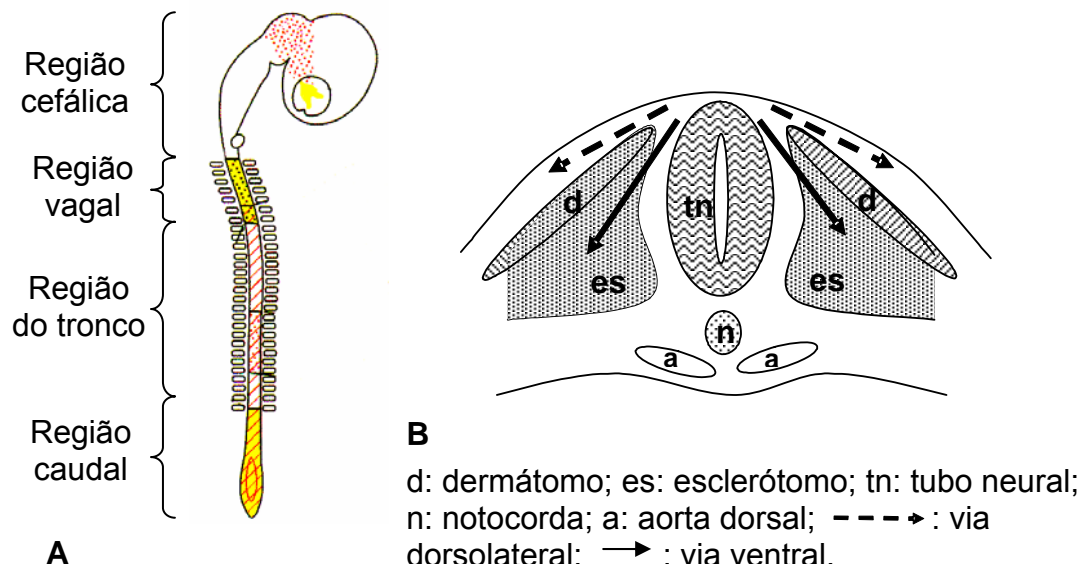


Ilustração 01 – Representação esquemática A) dos níveis axiais do tubo neural. B) das vias migratórias da crista neural.

Dois modelos tentam explicar a distribuição das células da crista neural em suas vias de migração e a origem dos diferentes fenótipos. O primeiro modelo postula que as células da crista neural são pluripotentes e diferenciam-se de acordo com as condições ambientais que encontram após a migração (LE DOUARIN e ZILLER, 1993). O segundo modelo propõe que as células da crista neural, apesar de semelhantes, possuem especificidade bioquímica e/ou molecular que determina a via de migração a seguir (ERICKSON e GOINS, 1995). A especificidade anterior à migração foi demonstrada pela observação de precursores de melanócitos na região dorsal do tubo neural antes que as células tomassem a via dorsolateral (REEDY et al., 1998).

### 1.3 O DESENVOLVIMENTO DA LINHAGEM MELANOCÍTICA DERIVADA DA CRISTA NEURAL

Os progenitores dos melanócitos são os melanoblastos, células despigmentadas, mas que possuem o potencial para produzir melanina.

Em aves, a origem das células pigmentares a partir da crista neural foi estabelecida por DORRIS, em 1936. Quando as células se destacam do tubo neural, entram em uma zona de células livres, rica em moléculas da matriz extracelular.

Logo se misturam às células livres, tornando-se morfológicamente indistinguíveis. Desta forma, para se estudar sua migração é necessária a utilização de várias técnicas (WESTON, 1963; TUCKER et al., 1984). Com o uso do anticorpo Smyth line produzido por galinhas com doença despigmentante semelhante ao vitiligo (SEARLE et al., 1993), conseguiu-se a marcação de células da linhagem melanocítica em seus estágios iniciais de diferenciação, sendo possível identificá-las logo acima do tubo neural, antes de iniciarem a migração pela via dorsolateral (REEDY et al., 1998). Este anticorpo é um importante instrumento de análise, já que possibilita a detecção das células em estágios em que morfológicamente ainda não é possível reconhecê-las como da linhagem melanocítica. Além do mais permite mostrar que as células que têm sua saída do tubo neural atrasada estão especificadas como melanoblastos e são as únicas que tomam a via dorsolateral de migração na região do tronco.

A composição da matriz extracelular parece também ter papel importante na definição da via migratória tomada pelas células (ERICKSON e TURLEY, 1983). Em células da crista neural a expressão diferencial de receptores de membrana que intermediam a interação com componentes de matriz, como integrinas (LALLIER e BRONNER-FRASER, 1991) ou receptores para efrinas (KRULL et al., 1997), parece estar envolvida no direcionamento da migração. A migração de melanoblastos pode, portanto, estar sendo controlada por barreiras de origem molecular presentes no meio e que servem de vias migratórias (ERICKSON e PERRIS, 1993). Por outro lado, esta expressão pode ser estimulada por aumento de interações de adesão entre as células e a matriz extracelular (BEAUVAIS et al., 1995). Adesões célula-célula envolvem principalmente as caderinas que foram detectadas também em células da crista neural. É possível que precursores de melanócitos expressem caderinas próprias que permitam ou facilitem sua migração ao interagirem com caderinas no dermomiótomo. Ou, talvez, os melanoblastos não possuam, na verdade, determinados receptores cuja ausência neutralizaria a ação de moléculas que funcionam como inibidores de migração ou que provocam afastamento de determinadas vias.

Nas aves, os melanoblastos penetram na ectoderme (ERICKSON et al., 1992), onde ainda se dividem e se diferenciam em melanócitos. Fatores secretados sobre as células de linhagem melanocítica ou na superfície de outras células parecem ser essenciais para a sobrevivência delas, porém não parecem ser

determinantes de aumento na população. Em células precursoras de melanócitos, antes de sua migração dorsolateral, ocorre a expressão do receptor tirosina-quinase (*c-kit*), cujo ligante é o stem cell factor ou *steel factor* (SCF) (WEHRLE-HALLER e WESTON, 1995). Em cultura, este receptor é expresso exclusivamente por precursores de melanócitos na população de células da crista neural e parece ser necessário em diferentes momentos do processo de desenvolvimento de melanócitos, estando envolvido na entrada das células na ectoderme e em sua ativação no folículo piloso. O *Steel factor* está relacionado com a sobrevivência inicial de precursores de melanócitos em camundongos (MACKENZIE et al., 1997). Em aves, a sobrevivência de precursores de melanócitos é mediada pela combinação do *Steel factor* e uma neurotrofina (NGF, BDNF ou NT-3) (LANGTIMM-SEDLACK et al., 1996).

O destino quase exclusivo das células especificadas para a linhagem melanocítica é a mesoderme e a ectoderme, que originam a pele na maioria das aves (HULLEY et al., 1991). A entrada destas células na ectoderme acontece a partir do estágio 22 (3½ dias de incubação), em sítios associados a interrupções locais da membrana basal provocadas possivelmente por enzimas proteolíticas produzidas pelas próprias células pré-melanocíticas (ERICKSON et al., 1992). Os melanoblastos penetram na epiderme a partir do 4º até o 10º dia e a partir daí encontram-se somente na epiderme. A penetração do melanoblasto na pele ocorre inicialmente na região dorsal e progressivamente na ventral. Antes da deposição de pigmentos evidencia-se aumento do núcleo e citoplasma. Essa diferenciação é influenciada pelo micro-ambiente, pois somente melanoblastos no broto da pena diferenciam-se. Os da epiderme, entre os brotos das penas, funcionam como células-fonte para pigmentação das próximas gerações de penas. Os melanócitos e melanoblastos da epiderme proliferam pela ação do fator de crescimento do fibroblasto (FGF) produzido pelos queratinócitos (HALABAN et al., 1987), demonstrando a importância do contato melanócito-queratinócito para sobrevivência do melanócito.

Depois que os melanoblastos se estabelecem em seus sítios específicos, eles se diferenciam em células produtoras de melanina (melanócitos) ao sintetizar grânulos melanossomais no qual o substrato tirosina é convertido em polímeros de melanina. Os melanócitos nos tecidos dos adultos são permanentemente residentes, raramente se dividem ou migram. Assim, estas populações de melanócitos podem

permanecer melanogenicamente ativas nos sítios cutâneos ou tornarem-se melanogenicamente inativas nos sítios extracutâneos, por toda a vida do indivíduo (BOISSY e NORDLUND, 1997).

#### 1.4 MELANOGÊNESE

A síntese de melanina nos melanócitos está restrita aos melanossomas e seus elementos enzimáticos e estruturais são organizados e agregados separadamente em um processo semelhante à formação do lisossoma (JIMBOW et al., 2000), embora as vias de transporte sejam diferentes entre os melanossomas e lisossomas (FUJITA et al., 2001). Em geral, a estrutura do melanossoma se relaciona ao tipo de melanina produzida. O melanossoma que produz a eumelanina é elíptico e contém matriz fibrilar, enquanto a forma do feomelanossoma é variável, mas com contorno normalmente arredondado e com matriz vesiculoglobular (SLOMINSKI et al., 2003).

Os melanossomas e seus precursores podem ser classificados em quatro estágios de desenvolvimento baseados na sua morfologia (KUSHIMOTO et al., 2001). No estágio I as vesículas esféricas são desprovidas de melanina e possuem uma matriz desorganizada. No estágio II, os melanossomas são alongados, com estriações internas bem definidas. A deposição de melanina começa no estágio III, se acumulando nas estruturas transversais, resultando em um espessamento e escurecimento das estriações. Quando o melanossoma está totalmente preenchido por melanina é chamado de melanossoma no estágio IV.

A proteína *silver locus* (Pmel17 ou gp100) é encaminhada inicialmente para os melanossomas do estágio I onde vai ser parcialmente clivada devido à natureza altamente proteolítica das enzimas presentes no meio (KUSHIMOTO et al., 2001). Sua quebra e processamento acompanham a reestruturação dos melanossomas iniciais de vesículas arredondadas com componentes amorfos (estágio I) para estruturas fibrilares alongadas (estágio II) (KUSHIMOTO et al., 2001). Somente quando os melanossomas passam para o estágio II é que as enzimas tornam-se resistentes à proteólise e a produção da melanina prossegue. A melanogênese propriamente dita começa quando a tirosinase e outras enzimas importantes são clivadas, sendo dependentes de um meio ácido provido por bombas de prótons.

Dados apóiam a sugestão de que o produto do gene *p* (*pink-eyed dilution*) é essencial para o desenvolvimento normal do número, estrutura e melanização do melanossoma (HEARING et al., 1973) e que a proteína *p* parece ser inserida diretamente nos melanossomas do estágio II sem passar pelas vesículas derivadas da rede *trans* do Golgi (TGN) (ROSEMBLAT et al., 1994).

## 1.5 PELE DA AVE

A pele das aves é similar à de outros vertebrados superiores, exceto por ser mais fina quando comparada com os mamíferos de igual tamanho. A taxa metabólica também é baixa, exceto nas penas (FERREL, 2002).

Durante o início do desenvolvimento, o epitélio que recobre o embrião é formado por uma camada de células basais cúbicas e uma camada superficial de células achatadas. As células da camada basal se proliferam rapidamente para formar um epitélio estratificado no 17<sup>o</sup> dia de desenvolvimento. Neste estágio, a epiderme é composta por uma camada basal mitoticamente ativa, por células espinhosas em diferenciação e pelas células queratinizadas totalmente diferenciadas. O desenvolvimento da pele, dependendo do local estudado, apresenta diferentes padrões de diferenciação (PARAKKAL e MATOLTSY, 1968). O estrato granuloso, nos mamíferos, se encontra entre o estrato espinhoso e o córneo e suas células possuem grânulos de queratohialina. A existência deste estrato nos embriões de galinha é controversa. Embora alguns trabalhos não confirmem sua existência, PARAKKAL e MATOLTSY (1968), através da microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram a presença deste estrato na epiderme da galinha da raça Leghorn. Como os grânulos de queratohialina são muito pequenos na galinha, talvez estejam no limite de resolução do microscópio de luz e por isto sejam pouco visíveis.

A periderme é uma estrutura transitória que atua como uma proteção de recobrimento para a epiderme em desenvolvimento. Ela é formada, normalmente, por duas camadas de células, que se mantêm pela atividade mitótica própria. Na raça Leghorn, aos 6 dias de incubação, a periderme consiste de uma camada basal e outra superficial. Com 14 dias, as células epidermais contêm grande quantidade de glicogênio e muitos grânulos peridermais sendo que, com 17 dias, o conteúdo de

glicogênio é depletado e as células da periderme se preenchem com uma massa fibrosa (PARAKKAL e MATOLTSY, 1968). Os grânulos da periderme foram descritos como se fossem de queratohialina, porém provou-se que estes grânulos diferem morfológicamente dos grânulos de queratohialina e que podem ser identificados pela microscopia eletrônica de transmissão (PARAKKAL e MATOLTSY, 1968). A periderme está presente na pele humana durante o desenvolvimento do embrião, mas grânulos citoplasmáticos similares aos observados nos embriões de galinha não são encontrados. Então, é possível que estes grânulos exerçam uma função específica na periderme da galinha. A periderme protege a epiderme durante o desenvolvimento embrionário e torna-se desnecessária quando o estrato córneo está pronto para assumir sua função, desaparecendo a seguir.

Abaixo de toda esta estrutura está a lamela dermal. No embrião de galinha, esta lamela consiste de várias camadas de fibras colágenas orientadas ortogonalmente e fibroblastos, que permeiam as fibras (PARAKKAL e MATOLTSY, 1968).

Na galinha adulta (FERREL, 2002), a pele é composta por duas camadas anatômicas principais: a epiderme e derme. O sistema tegumentar tem o arranjo mostrado no quadro abaixo:

Quadro 1- Divisão anatômica do sistema tegumentar da ave (FERREL, 2002)

EPIDERME	MEMBRANA BASAL = JUNÇÃO DERMOEPITELIAL	DERME	TECIDO SUBCUTÂNEO
estrato córneo estrato germinativo estrato de transição estrato intermediário estrato basal			estrato superficial estrato profundo estrato compacto estrato frouxo lâmina elástica

O estrato córneo é fino e, às vezes, inexistente em algumas espécies de aves. A redução na espessura do estrato também auxilia na diminuição do peso corporal, o que auxilia no vôo.

A epiderme é avascular, sendo sua nutrição feita por simples difusão através da derme nas áreas de pele fina ou, então, através de estruturas adaptativas nas regiões mais espessas. Estas estruturas consistem de uma interface entre a derme e a epiderme para aumentar a área de contato e permitir que mais capilares fiquem próximos à epiderme. Normalmente, a epiderme é muito fina nas regiões cobertas por penas e espessa nas regiões desprovidas de pena como face, bico, pernas e pés (FERREL, 2002).

A derme é formada por um tecido conjuntivo fibroso, contendo vasos sanguíneos, nervos, tendão, corpúsculos sensoriais, músculos lisos que unem os tratos das penas (músculo apterial) e folículos da pena ectodermis com vários músculos lisos (músculos da pena) que se estendem abaixo deles. As fibras colágenas, na ave, estão mais nitidamente arranjadas em uma orientação horizontal, com poucas fibrilas verticais, o que difere dos mamíferos que apresentam um arranjo mais irregular. Este arranjo de fibras, nas aves, resulta em uma derme mais fina, que também pode auxiliar no voo e na flexibilidade cutânea. Outra estrutura única na derme das aves é o desenvolvimento de tendões das fibras elásticas que conectam os músculos lisos da derme: os músculos da pena e o músculo apterial. A rica vascularização confere uma coloração avermelhada à barbela e outros apêndices da pele (FERREL, 2002).

O tecido subcutâneo possui duas camadas, uma superficial e outra profunda. Este tecido consiste de fibras colágenas arranjadas desordenadamente, adipócitos e tecido muscular estriado esquelético. O tecido subcutâneo é o principal órgão de estocagem de gordura, com numerosos adipócitos, principalmente nas aves aquáticas. Os principais vasos e nervos atravessam a sub-cútis para chegar até as estruturas cutâneas. O tecido subcutâneo está ausente da região terminal do esqueleto apendicular, com a lâmina elástica localizando-se sobre o músculo esquelético ou perióstio (FERREL, 2002).

A vascularização cutânea das aves é bastante difusa e os nervos sensoriais acompanham os vasos cutâneos. Os nervos sensoriais da derme estão no plexo profundo subepidermal e os nervos sensoriais da epiderme penetram a camada basal da epiderme (FERREL, 2002).

## 1.6 GALINHA SEDOSA JAPONESA

A galinha Sedosa Japonesa está entre as mais velhas das raras raças de galinha doméstica. O primeiro registro da Sedosa é encontrado em um livro chinês, o *Wu lei xiang gan zhi*, escrito por Su Dongpo (1037-1101, de acordo com <http://www.silkqin.com/09hist/other/sushi.htm>, no século XI. Esta raça foi introduzida no Japão a partir da China ou Índia no início do século XVII. As raças modernas da galinha Sedosa estão estabelecidas no Japão e China apesar de se encontrarem espalhadas pelo mundo todo. No Japão é conhecida como Sedosa Japonesa, ou Ukokkei em japonês. Em 1942, foi apontada como um tesouro natural do Japão.

A galinha Sedosa Japonesa possui inúmeras características exclusivas como penas nos pés, lobos do ouvido de um tom azul turquesa, crista de um vermelho bem acentuado, polidactilia, penas macias, além de possuir uma extensa pigmentação dérmica e visceral (NOZAKI e MAKITA, 1998; MUROYA et al., 2000). Além das características externas, elas também apresentam características de comportamento bem peculiares: são tranqüilas e domesticáveis, sendo utilizadas até como animais de estimação, além de serem ótimas chocadeiras. WADA e colaboradores (2004) compararam o DNA mitocondrial da Sedosa com o da Leghorn Branca e encontraram uma similaridade entre as duas raças de 99.77%; havia diferenças somente em 39 nucleotídeos de um total de 16.784 pares de bases.

Foi demonstrado, por meio de transplantes heteroespecíficos, que a diferença de pigmentação entre a galinha Sedosa e outras linhagens não estaria relacionada com características intrínsecas das células da crista neural, da qual se derivam as células pigmentares, mas com fatores presentes no seu meio ambiente (HALLET e FERRAND, 1984). Contudo, REEDY e colaboradores (1998), utilizando o soro Smyth line como marcador, demonstraram que em embriões de galinha Sedosa os melanoblastos são previamente especificados.

Como dito anteriormente, em galinhas normais, os melanoblastos penetram na ectoderme (ERICKSON et al., 1992) para se diferenciarem em melanócitos. Na mutante Sedosa Japonesa eles seguem pela via dorsolateral penetrando na ectoderme, mas também seguem a via ventral (REEDY et al., 1998; FARACO et al., 2001) para invadir as vísceras e colocar-se no tecido conjuntivo de praticamente todos os órgãos, com exceção do endocárdio, pâncreas, fígado e baço. Assim,



nestas aves, os melanócitos são encontrados na derme, no tecido conjuntivo das vísceras, meninges, mesentério e peritônio, no tubo digestivo, paredes vasculares e algumas glândulas (MAKITA e TSUZUKI, 1986; FARACO et al., 2001).

Provavelmente, o *steel factor* não apresenta na mesoderme da galinha Sedosa o mesmo papel exercido em outras raças de galinha, pois foi observado, na Sedosa, que células que expressam o *c-kit* invadem órgãos derivados da mesoderme que não expressam o gene do *Steel factor*, seu ligante. Este aspecto sugere que outro fator possa ser responsável pela sobrevivência e proliferação das células melanocíticas na mesoderme desta mutante (LECOIN et al., 1995).

Ao observar que em embriões de Sedosa, se comparados com os de outras raças, havia uma dispersão mais rápida de melanoblastos na área dorsolateral, REEDY e colaboradores (1998) propuseram que o meio ambiente migratório promoveria a motilidade dessas células, acentuaria sua invasividade e estimularia sua proliferação. Esta hipótese coincide com as observações de LECOIN e colaboradores (1994), que mostraram que o extrato de tecidos da galinha Sedosa é mais eficaz no estímulo da proliferação celular, *in vitro*, se comparado com o de outras espécies de galinhas.

O ambiente influencia a diferenciação do melanócito, que geralmente acontece na epiderme. Porém, a derme também tem a capacidade de induzir a diferenciação, mas não de sustentar a sobrevivência do melanócito após o 8º dia (HULLEY et al., 1991). Na Sedosa ocorre a diferenciação dos melanoblastos nas penas, derme, tecido conjuntivo de vísceras e vasos, periósteo e pericôndrio (MAKITA e TSUZUKI, 1986).

## 1.7 OBJETIVOS

Com base nos dados já existentes que apontam para possíveis diferenças nas características celulares, bem como micro-ambientais, o presente trabalho objetiva caracterizar os melanócitos dermais, do 6º ao 19º dia de desenvolvimento, do embrião da ave Sedosa Japonesa (SK) de plumagem branca neste local ectópico, já que são células encontradas, normalmente, na epiderme. Para atingirmos este objetivo geral será preciso:

- \* Identificar, através da imunocitoquímica, a migração final dos melanoblastos e sua invasão na epiderme e derme de embriões da SK.
- \* Verificar quando e onde os melanoblastos da SK iniciam e completam sua diferenciação em células maduras (melanócitos).
- \* Descrever, morfológicamente, os melanócitos presentes na derme dos embriões da SK.
- \* Relacionar os melanócitos com componentes da matriz extracelular e células presentes na derme dos embriões da SK.
- \* Caracterizar, ultraestruturalmente, os melanócitos dermais em embriões da SK.
- \* Descrever o processo da melanogênese que ocorre nos melanócitos dermais de embriões da SK.
- \* Verificar o destino tomado pelos melanossomas nos melanócitos dermais de embriões da SK.

Esta tese está dividida em 4 capítulos, sendo o primeiro uma introdução e revisão de literatura. No segundo capítulo, analisa-se a distribuição dos melanoblastos durante o caminho migratório final e sua localização na pele depois da diferenciação em melanócitos. Também são caracterizados, morfológicamente, os melanócitos dermais da SK, em vários estágios de desenvolvimento, para tentar esclarecer dados referentes à função fisiológica que eles poderiam exercer nesta distribuição ectópica. Este capítulo encontra-se no formato do artigo que foi submetido para publicação na revista **The Anatomical Record**. No capítulo 3, foram enfocados o processo de melanogênese nos melanócitos dermais do embrião da SK, com 19 dias de incubação, e a análise do padrão de distribuição dos melanossomas. Este trabalho está em fase final de adequação às normas da editora, a fim de ser submetido para publicação na revista **Anatomy and Embriology**. O capítulo 4 contém as considerações finais deste trabalho e as perspectivas futuras.

## REFERÊNCIAS

- BEAUVAIS, A.; ERICKSON, C.A.; GOINS, T.; CRAIG, S.E.; HUMPHRIES, M.J.; THIERY, J.P.; DUFOUR, S. Changes in the fibronectin-specific integrin expression pattern modify the migratory behavior of sarcoma S180 cells in vitro and in the embryonic environment. **J. Cell Biol.** 128, p.699-713, 1995.
- BOISSY, R.E.; NORDLUND, J.J. Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. **Pigment Cell Res.** 10, p.12-24, 1997.
- DORRIS F. Differentiation of pigment cells in tissue cultures of chick neural crest. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 34, p.448-449, 1936.
- ERICKSON, C.A.; GOINS, T.G. Avian neural crest cell migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanoblasts. **Development** 121, p.915-924, 1995.
- ERICKSON, C.A.; PERRIS, R. The role of cell-cell and cell matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. **Dev. Biol.** 159, p.60-74, 1993.
- ERICKSON, C.A.; TURLEY, E.A. Substrata formed by combinations of extracellular matrix components alter neural crest cells motility in vitro. **J. Cell Sci.** 61, p.299-323, 1983.
- ERICKSON, C.A.; DUONG, T.D.; TOSNEY, K.W. Descriptive and experimental analysis of the entry into ectoderm in the chick embryo. **Dev. Biol.** 151, p.251-272, 1992.
- FARACO, C.D., VAZ, S.A., PASTOR, M.V., ERICKSON, C.A. Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. **Dev. Dyn.** 220, p.212-225, 2001.
- FERREL, S.T. Avian Integumentary Surgery. **Seminar in Avian and Exotic Pet Medicine** 11, p.125-135, 2002.
- FUJITA, H.; SASANO, E.; YASUNAGA, K., FURUTA, K.; YOKOTA, S.; WADA, I.; HIMENO, M. Evidence for distinct membrane traffic pathways to melanosomes and lysosomes in melanocytes. **J Invest. Dermatol. Symp. Proc.** 6, p.19-24, 2001.
- GILBERT, S.F. **Embriology**. Constructing the organism. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.
- HALABAN, R.; GHOSH, S.; BAIRD, A. bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 23, p.47-52, 1987.
- HALLET, M.M.; FERRAND, R. Quail melanoblast migration in two breeds of fowl and in their hybrids: evidence for a dominant genic control of the mesodermal pigment cell pattern through the tissue environment. **J. Exp. Zool.** 230, p.229-238, 1984.

- HEARING, V. J.; PHILLIPS, P.; LUTZNER, M. A. The fine structure of melanogenesis in coat color mutants of the mouse. **J. Ultrastructure Res.** 43, p.88-106, 1973.
- HULLEY, P.A.; STANDER, C.S.; KASON, S.H. Terminal migration and early differentiation of melanocytes in embryonic chick skin. **Dev. Biol.** 145, p.182-194, 1991.
- JIMBOW, K.; PARK, J.; KATO, F.; HIROSAKI, K.; TOYOFUKU, K.; HUA, C.; YAMASHITA, T. Assembly, target-signaling and the intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stages of melanosome biogenesis. **Pigment Cell Res.** 13, p.222-229, 2000.
- KRULL, C.E.; LANSFORD, R.; GALE, N.W.; COLLAZO, A.; MARCELLE, C.; YANCOPOULOS, G.D.; FRASER, S.E.; BRONNER-FRASER, M. Interactions of Eph related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. **Curr. Biol.** 7, p.571-580, 1997.
- KUSHIMOTO, T.; BASRUR, V.; VALENCIA, J.; MATSUNAGA, J.; VIEIRA, W. D.; FERRANS, V.J.; MULLER, J.; APPELLA, E.; HEARING, V.J. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98, P.10698-10703, 2001.
- LALLIER, T.; BRONNER-FRASER, M. Avian neural crest cell attachment to laminin: involvement of divalent cation dependent and independent integrins. **Development** 113, p.1069-1084, 1991.
- LANGTIMM - SEDLACK, C. J.; SCHROEDER, B.; SASKOWSKI, J. L.; CARNAHAN, J. F.; SIEBER-BLUM, M. Multiple actions of stem cell factor in neural crest cell differentiation *in vitro*. **Dev. Biol.** 174, p.345-359, 1996.
- LECOIN, L.; MERCIER, P.; LE DOUARIN, N.M. Growth of neural crest cells *in vitro* is enhanced by extracts from Silky Fowl embryonic tissues. **Pigment Cell Res.** 7, p. 210-216, 1994.
- LECOIN, L.; LAHAV, R.; MARTIN, F.H.; TEILLET, M.A.; LE DOUARIN, N.M. *Steel* and *c-kit* in the development of avian melanocytes: A study of normally pigmented birds and of the hyperpigmented mutant Silky fowl. **Dev. Dyn.** 203, p.106-118, 1995.
- LE DOUARIN, N. M. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. **Dev. Biol.** 30, p.217-222, 1973.
- LE DOUARIN, N. M. **The neural crest.** Cambridge University Press, Cambridge. 1982.
- LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. **The neural crest.** 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1999.

LE DOUARIN, N. M; ZILLER, C. Plasticity in neural crest cells differentiation. **Curr. Opin. Cell Biol.** 5, p.1036-1043, 1993.

MACKENZIE, M.A.F.; JORDAN, S.A.; BUDD, P.S.; JACKSON, I.J. Activation of the receptor tyrosine kinase kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. **Dev. Biol.** 192, p.99-107, 1997.

MAKITA, T., TSUZUKI, Y. Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl. II. Embryological survey. **Yamaguchi J. Vet. Med.** 13, p.11–20, 1986.

MUROYA, S. ; TANABE, R. I. ; NAKAJIMA, I. ; CHIKUNI, K. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the Silky fowl. **J. Vet. Med. Sc.** 62, p.391–395, 2000.

NIETO, M.A.; SARGENT, M.G.; WILKINSON, D.G.; COOKE, J. Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. **Science** 264, p.835-839, 1994.

NOZAKI, A.; MAKITA, T. The surface color measurement of major tissues of Silky fowls and White Leghorns. **J. Vet. Med. Sc.** 60:489–493, 1998.

PARAKKAL, P.F.; MATOLSTYS, A.G. An electron microscopic study of developing chick skin. **J. Ultrastructure Res.** 23, p.403-416, 1968.

REEDY, M.V.; FARACO, C.D.; ERICKSON, C.A. The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. **Dev. Biology** 200, p.234-246, 1998.

ROSEMBLAT, S.; DURHAM-PIERRE, D.; GARDNER, J.M.; NAKATSU, Y.; BRILLIANT, M.H.; ORLOW, S.J. Identification of a melanosomal membrane protein encoded by the pink-eyed dilution (type II oculocutaneous albinism) gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, p.12071-12075, 1994.

SEARLE, E.A.; AUSTIN, L.M.; BOISSY, Y.L.; ZHAO, H.; NORDLUND, J.J.; BOISSY, R. Smyth chicken melanocyte autoantibodies: cross-species recognition, in vivo binding, and plasma membrane reactivity of the antiserum. **Pigment Cell Res.** 6, p.145-157, 1993.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol. Rev.** 84, p.1155-1228. 2003.

TUCKER, G.C.; AOYAMA, H.; LIPINSKI, M.; TURSZ, T.; THIERY, J.P. Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. **Cell Differ.** 14, p.223-233, 1984.

WADA, Y.; YAMADA, Y.; NISHIBORI, M.; YASUE, H. Complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in Silkie fowl (*Gallus gallus var. domesticus*). **J Poultry Sci.** 41, p.76-82, 2004.

WEHRLE-HALLER, B.; WESTON, J.A. Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. **Development** 121, p.731-742, 1995.

WESTON, J.A. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. **Dev. Biol.** 6, p. 279-310, 1963.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Ed. Artemed, Porto Alegre, 2000.

## **CAPÍTULO 2**

### **SPECIAL FEATURES OF DERMAL MELANOCYTES IN WHITE SILKY CHICKEN EMBRYOS**

## **SPECIAL FEATURES OF DERMAL MELANOCYTES IN WHITE SILKY CHICKEN EMBRYOS**

CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI-MACHADO\*<sup>1</sup>, PATRÍCIA FRANCHI DE FREITAS<sup>1</sup>,  
MARISA ESSENFELDER BORGES<sup>2</sup>, and CLORIS DITZEL FARACO<sup>1</sup>

1- Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Departamento de Biologia  
Celular, UFPR, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, Brazil, 81531-990.  
[cfom@ufpr.br](mailto:cfom@ufpr.br)

2- Unibrasil, Curitiba, PR, Brazil

\*Correspondence to: Claudia Feijó Ortolani-Machado, Rua Vicente Machado 127, 16.  
80420-010, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: [cfom@ufpr.br](mailto:cfom@ufpr.br)

ABBREVIATED TITLE FOR PAGE HEADINGS:

ORTOLANI-MACHADO et al. – Features of Silky chicken dermal melanocytes



**ABSTRACT**

In the hyperpigmented Silky chicken, melanoblasts are neural crest cells that emigrate from the neural tube, migrate dorsolaterally, close to the ectoderm and medioventrally, reaching visceral regions of the embryo, as well as populating the dermis. In this work we have analyzed the morphology and distribution of melanocytic lineage cells in white SK embryos at later stages of development (6 to 19 days of incubation), in an attempt to understand the conditions that allow their maintenance throughout development. We focused in the dorsal skin dermis. Melanoblasts and immature melanocytes were seen at all analyzed stages, some of them clearly proliferative, suggesting a possibility of continued renewal of the population. Mature, fully differentiated melanocytes are elongated cells with many long cytoplasmic processes, forming a meshwork in superficial dermis, below a layer of collagen and elastic fibers that seems to prevent melanocytic lineage cells from reaching the epidermis at these later stages. Melanomacrophages in the dermis engulf melanosomes exocytosed in the matrix. Mast cells are seen close to melanocytes. Both occur around blood vessels. Probably another role besides pigmentation might be exerted by the ectopic, permanent melanocytic population in the dermis of SK.

**KEYWORDS:** later embryo, morphologic characterization, fibers, cells of dermis

## 1. INTRODUCTION

Melanocytes are cells that produce melanin in special organelles called melanosomes. In birds, these cells are found only in the feathers epidermis to give them color. Dorris (1936) was the first to point the origin of melanocytes from the neural crest. In the trunk of avian embryos, the first wave (2½ days of incubation) of neural crest cells migrate ventrally between the neural tube and the somite, and give rise to neurons or glial cells of the peripheral nervous system (Le Douarin and Teillet, 1974). After 24 h, with the cessation of ventral migration, occurs the onset of dorsolateral migration, between the somite and ectoderm. The cells taking this migratory path invade the dermis and epidermis and differentiate as melanocytes (pigment cells) of the skin (Erickson et al., 1992; Kitamura et al., 1992).

The Japanese Silky fowl (SK) is a breed of chicken originated from China. They are short, with a small head and a short neck, lumpy combs, turquoise earlobes, and their plumage varies in color (white, black, blue, partridge, grey). Albeit the various feather colors, all Silkies show uncommon characteristics like feathers on their feet, five toes, and fluffy feathers besides the extensive pigmentation in the dermis and connective tissue of internal organs (Makita and Mochizuki, 1984; Makita and Tsuzuki, 1986; Nozaki and Makita, 1998; Muroya et al. 2000; Faraco et al., 2001). Due to the abnormal pattern of pigmentation, the SK fowl has been an useful model system to investigate the processes related to pigmentation. We previously showed that melanoblasts in the SK embryos have the ability to follow both dorsolateral and ventral pathways, populating more internal regions of the embryo (Reedy et al., 1998a; Faraco et al., 2001). The early migratory pathways of melanoblasts have been described in chicken (Weston, 1963; Teillet and Le Douarin, 1970; Bronner-Fraser and Fraser, 1988; Reedy et al., 1998 a,b; Faraco et al., 2001) but not which is the fate of the melanoblasts in well-developed embryos.

In mammals, melanocytes are usually epidermic and their pigment protect the nucleus of the keratinocytes against ultraviolet light (UV) damage, but sometimes it is possible to note their presence in the dermis in normal (reviewed by Quevedo and Holstein, 1998) or abnormal (Hori et al., 1984; Hidano and Kaneko, 1991; Murakami et al., 2005) situations.

In SK, melanocytes are seen in the dermis in great quantity. What is the meaning of the massive presence of these pigment cells there? The present study analyzed the morphological aspects and localization of melanocytes in the skin of the hyperpigmented SK embryos, in an attempt to understand the role of these pigment cells in the dermis, in comparison with embryos of other chicken breed, White Leghorn, that show no pigmentation.

Our results show that melanoblasts and immature melanocytes are found in the dermis until later development of the embryo (19-days) and that some of them are proliferative. The shape of melanocytes varies from round to elongated with long and dendritic cytoplasmic processes, according to the localization in the dermis. The connective tissue of the dermis is rich in collagen and elastic fibers and different kinds of resident cells (fibroblasts, macrophages, mast cells). In SK the fibers and melanocytes can be scattered through deep dermis while elongated, dendritic melanocytes are organized as a meshwork below a thick layer of collagen and elastic fibers found close to the epidermis. At these later stages, melanocytes seem to be prevented from reaching the epidermis and the epidermal population gradually disappears. Melanomacrophages show evidence of active phagocytosis of free melanosomes or portions of melanocytes cytoplasm, but we could see no signs of direct interaction between mast cells and melanocytes, besides the spacial relationship.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Embryos

Eggs of White Japanese Silky (SK) and White Leghorn (WL) chickens (*Gallus gallus*) were obtained from the Avian Facilities at Universidade Federal do Paraná. The eggs were incubated at 38°C in a forced-draft incubator and embryos were staged (stages 29 to 45) according to Hamburger and Hamilton (1951). Stages 29 to 45 correspond to incubation times of 6 to 19 days, respectively.

### 2.2 Light microscopy

14-19 days embryos were dissected and their dorsal skin was removed, fixed in 4% paraformaldehyde, washed in phosphate-buffered saline (PBS), dehydrated in ethanol, and embedded in Paraplast or JB4 historesin. Segments of 6-12 days embryos at trunk level were also fixed. Five-micrometer sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for general morphology, 1% toluidine blue (pH 2.8) for the identification of mast cells, Masson trichome for collagen fibers, and Weigert's method for elastic fibers (Drury and Wallington, 1980). Alternatively, dorsal skin of 6 to 16-days embryos was removed, fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS buffer, distended on histological slides, and dried on a warm plate at 45°C for posterior staining with HE. The slides were mounted with Permount and analyzed in an Olympus BX50 Microscope. The images were obtained with the aid of Image Pro Plus Software.

### 2.3 Electron microscopy

Small pieces of dorsal skin were fixed in 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer and 50mM NaCl, pH 7.4 for 2 h at room temperature. The sections were post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub>, stained *en bloc* with a solution of 2% aqueous uranyl acetate, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Spurr's resin (Spurr, 1969). After contrasting with aqueous uranyl acetate followed by Reynold's lead citrate (Reynolds, 1963) ultrathin sections were

examined in a JEOL-JEM 1200 EXII transmission electron microscope. Electronmicrographs were obtained with GATAN-MULTISCAN 600W Software.

#### 2.4. Acid Phosphatase Cytochemistry

Some of the specimens were prepared for ultrastructural demonstration of the enzymatic activity of acid phosphatase. The specimens were fixed with 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4 for 40 min at room temperature. After fixation the samples were washed in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH7.4, containing 7% sucrose, and then embedded in agar and chopped with a razor blade into 50  $\mu\text{m}$  thick sections that were used for cytochemical incubation. Before incubation the sections were rinsed in cacodylate-sucrose buffer and washed twice in the incubation buffer ( $5 \times 10^{-3}$  M acetate buffer pH 5.0 + 5% sucrose). Acid phosphatase (AcPase) was demonstrated by incubation with sodium- $\beta$ -glicerophosphate (Gomori, 1952) using cerium chloride as acceptor. After this, the sections were rinsed in the incubation buffer, and then in cacodylate-sucrose buffer, post-fixed in 1%  $\text{OsO}_4$ , in cacodylate buffer, dehydrated and embedded in Spurr's resin. Control consisted of incubation in which the substrate was omitted.

#### 2.5 Detection of melanoblasts and melanocytes in maturation

Cryosections were labeled with Smyth-line serum to detect the distribution of melanoblasts (Reedy et al., 1998a) and melanocytes in maturation. After fixation in 4% paraformaldehyde, segments of 6-12 days embryos at trunk level or pieces of 14-19-days skin were soaked in 5% and 15% sucrose, infiltrated in 7.5% gelatin/15% sucrose and snap-frozen in liquid nitrogen. Ten-micrometer sections were incubated with Smyth-line serum diluted 1:400 in PBS/1% BSA (Sigma), overnight at 4°C. The secondary antibody was FITC-goat anti-chicken (Chemicon) diluted 1:200. Slides were coverslipped with Gelmount (Biomedica) and analyzed using a Zeiss Axiophot microscope equipped with epifluorescence.

### 3. RESULTS

Our results are focused on the dorsal skin that is developing just over the neural tube and future vertebra.

#### 3.1 Melanoblasts final migratory pathway

We first documented the distribution of SK and WL melanoblasts during the final migratory pathway of these cells because other studies just described the early migratory paths (Reedy et al., 1998 a, b; Faraco et al., 2001). We used the serum from Smyth line (SI) chickens to specifically identify melanoblasts (Reedy et al., 1998a) and melanocytes in maturation. These results are summarized in table 1 and described below.

SK melanoblasts are still located immediately dorsal to neural tube in 6-days embryos (Fig. 1A). They are found in the ectoderm or epidermis (Fig. 1B), scattered in the mesoderm (Fig. 1A insert) or dermis, and in the dorsolateral and ventral paths in 6-10 days embryos. The SI labeling is present in round and elongated melanoblasts, as much in the cell body as in cytoplasmic processes (Fig. 1A insert). Each cell was analyzed at various focal points to get an image of its real shape. By 12-13 days, there are many melanoblasts in SK dermis and epidermis and the dermal elongated melanoblasts are always lying a good distance from the epidermis (Fig. 1C), and seem to contact each other through their cytoplasmic processes. Pigment cells in maturation (SI-positive plus mature melanin granules) are seen scattered in the dermis and near the blood vessels (Fig. 1D) until 19 days. At 19 days, SK melanoblasts disappear from the epidermis, that now has a thicker stratum corneum, but some are still found in the dermis (data not shown). In WL 6-days embryos, melanoblasts are located in the ectoderm, mesoderm and they follow the dorsolateral pathway. The distribution of WL melanoblasts differs from SK as in the dermis their number is progressively reduced (Fig. 1E) until they disappear (Fig. 1F) in the 10-days embryo. At 14-day no WL epidermal nor dermal melanoblasts are seen (Fig. 1G).

Table 1- Distribution of melanoblast in 6-19 days SK and WL embryos.

	6-days embryo		10-days embryo		12/13-d embryo		14-days embryo		19-days embryo	
	SK	WL	SK	WL	SK	WL	SK	WL	SK	WL
Melanoblasts located immediately dorsal to neural tube	X									
Melanoblasts in the ectoderm or epidermis	X	X	X	X	X	X	X			
Melanoblasts in the mesoderm or dermis	X	X	X		X		X		X	
Melanoblasts in the dorsolateral path	X	X	X							
Melanoblasts in the ventral path	X		X							
Melanocytes in maturation (SI-positive plus mature melanin granules)							X		X	

### 3.2 Distribution and characterization of dermal melanocytes

After identifying melanoblasts in the dermis and epidermis of embryos, we next wanted to know when or where they start the differentiation process, and which morphologic aspects the melanocytes show.

In SK embryos, during dissection, few melanocytes are seen at 7-days of incubation and at 10-days we can clearly see melanocytes in the feather bud where they are more concentrated, while only scattered cells are seen in the interfollicular skin. From day 14, the embryo has already a strikingly black skin while the feathers are white (Fig. 2A-B) in the strain we are describing. Sometimes it is possible to note a light brown coloration of the feathers (Fig. 2C) that disappears with the time. White Leghorn fowl does not present any coloration in the skin or feathers (Fig. 2A).

The distribution of mature pigment cells and their characterization was further examined by microscopic analysis. We showed, with the distension method, that it is possible to observe at 6-days, in SK dorsal dermis, few round and elongated (Fig. 3A) melanocytes containing melanosomes that are faintly melanized. There is a gradual increase of number of dermal melanocytes (Fig. 3A-E) and they acquire more melanized granules that delineate their dendritic processes (Fig. 3B). From 12-19 days, as well as round melanocytes (Fig. 3C and F), the embryos have elongated melanocytes contacting each other (Fig. 3H) that form a diffuse mesh in the dermis

(Fig. 3D and E) and around blood vessels (Fig. 3D and G). The distribution of melanocytes as a mesh was never seen with other methods, such as sections examined by light or transmission electron microscopy. In sectioned samples, we note that the round cells are actually in the deeper layers of the dermis, while the ones closer to the epidermis are elongated and in contact to each other (Fig. 4A). There are some free melanocytes scattered throughout the dermis. Fully differentiated pigment cells were never seen in the interfollicular epidermis (Fig. 4A and B). Some of maturing cells are proliferative cells even at later stages, as evidenced by the occurrence of mitosis (Fig. 4C and D).

### 3.3 Relationship between melanocytes and fibers

Elastic and collagen fibers are important components of the skin. Could these fibers play a role in the arrangement and localization of the dermal melanocytes? Elastic fibers are produced during early embryogenesis and exhibit a distribution pattern that is similar to that of collagen fibers. By 7-days, thin, short and irregular collagen and elastic fibers (Fig. 5A) are seen spread in both SK and WL embryos. Melanoblasts don't show any relationship with the thin fibers. A gradual deposition of fibers occurs with the development of the embryo (Fig. 5B-D). Older embryos show an increased quantity of collagen and elastic (Fig. 5C and D) fibers that are long, undulated and distributed predominantly parallel to the long axis of the epidermis in the superficial dermis. Few melanoblasts or melanocytes are found between this compact layer of fibers, the majority of them forming a meshwork immediately below the fibers (Fig. 5D). Even at ultrastructural level there is no evidence of close contact between the cells and the fibers. The pattern of distribution of both fibers is the same in WL, where there are no dermal melanocytes (Fig. 5A and C).

### 3.4 Melanocytes and other cells of the dermis

When compared with the dermis of WL, the hyperpigmented skin of SK showed no significant differences in the histologic features, except by the presence of melanocytes and macrophages (or mast cells) in close proximity. Is there a relationship between these cells in the dermis of SK embryos?



Melanocytes produce melanin pigments and transfer them to keratinocytes in the epidermis to produce feather color in bird skin (Smyth, 1990). In this study, we observed in the dermis of older embryos the close proximity of macrophage to intact melanocytes (Fig. 6B). Macrophages may be recognized by their big size, large cytoplasmic vacuoles, engulfed material presence, and acid phosphatase (AcPase) positive staining. Exocytosis of melanosomes by melanocytes occurs (Fig. 6A) and some diffuse melanin granules are found lying free in the connective tissue matrix (Fig. 6C). However, there is no evidence of direct transfer of melanosomes to other cells. Macrophages probably engulf free melanin granules seen in multivesicular bodies (Fig. 6E). We found also evidence of capture of debris of melanocyte's cytoplasm (Fig. 6F) by macrophages. AcPase-positive vacuoles with or without melanosomes were seen in some macrophages (Fig. 6G). When these cells contain vacuoles with melanin pigment they can be designated melano-macrophages or melanophages.

In the dermis of SK embryos, at later stages, mast cells with granules stained deep purple are seen close to melanocytes whose melanin granules are characteristically black. No cells containing both metachromatic and melanin granules are observed in the dermis of SK. Sometimes isolated round mast cells are seen throughout the dermis but usually they are very close to melanocytes as showed by transmission electron microscopy (Fig. 7A). Both of them are seen as elongated cells with the long axis paralleling the blood vessel wall (Fig. 7B-C). We never saw degranulated mast cells in the dermis or signs of release of substances by them. WL embryos mast cells had no evident relationship with other cells.

Figure 8 is a schematic representing the distribution of melanocytic lineage cells and components of the dermis, summarizing the results described above.

**FIGURES**

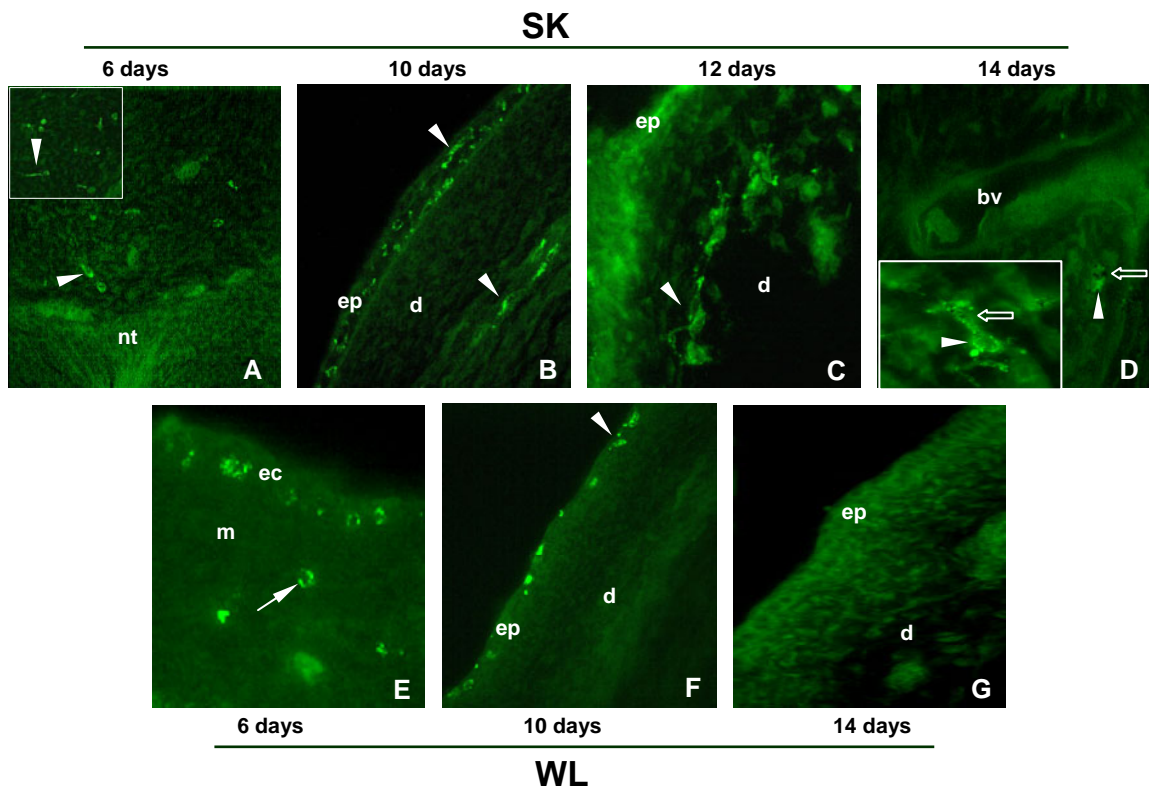


Fig. 1. Distribution of Silky (SK) and White Leghorn (WL) SI-positive cells (melanoblasts) at different stages of development. A-D: SK embryos; E-G: WL embryos; arrowheads: elongated melanoblasts; arrow: round melanoblast; ep: epidermis; ec: ectoderm; m: mesoderm; d: dermis; bv: blood vessel; nt: neural tube; open arrow: mature granule. A-C, F-G, insert A: 400x; D-E, insert D: 630x.

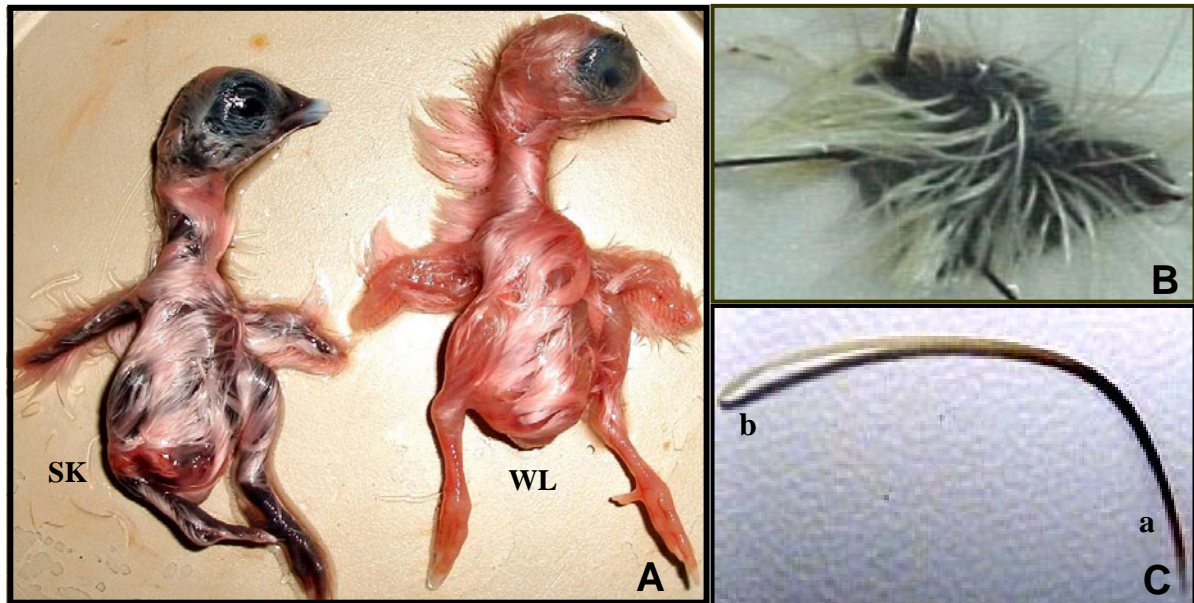


Fig. 2. (A) 16-days Silky and Leghorn embryos. (B) Piece of 19-days SK dorsal skin with characteristic black color and white feathers. (C) Feather of 16-days SK embryo. Note the lack of pigmentation close to the feather base and the light brown pigmentation at the apex. SK: Silky embryo; WL: White Leghorn embryo; a: feather apex; b: feather base.

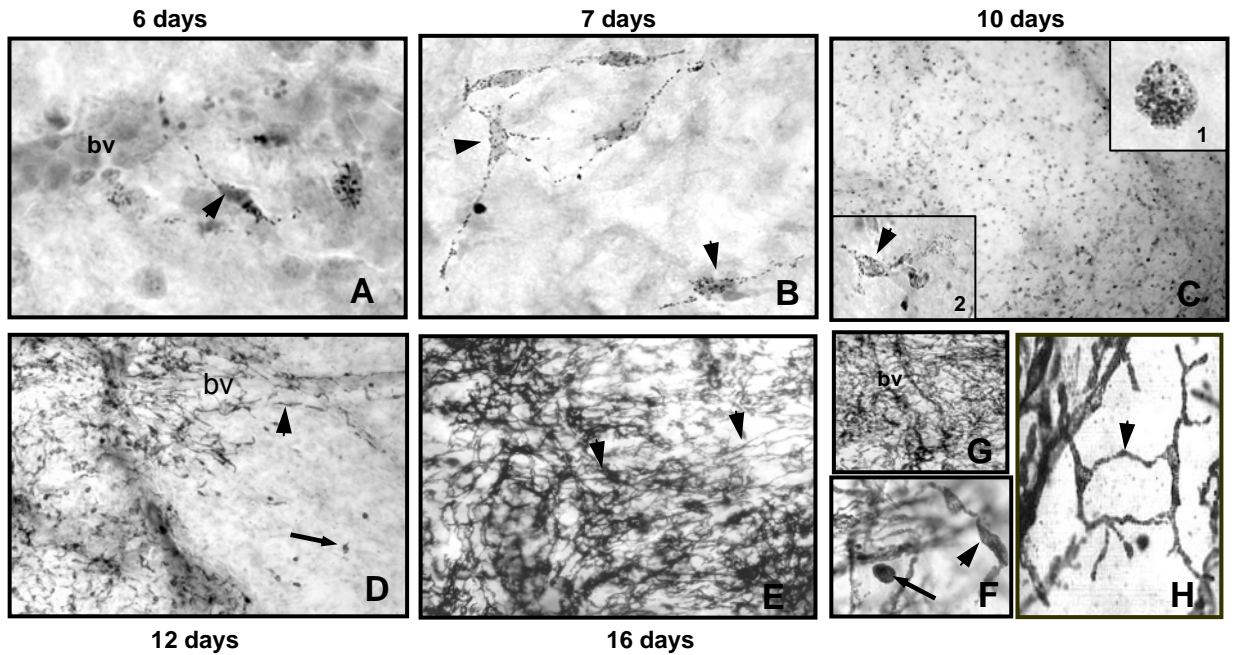


Fig. 3. Dermis of Silky embryos prepared by distension method. (A-E) Observe the increase of melanocytes number during the various stages of development. Inserts in (C): detail of round (1) and elongated (2) melanocytes. (F) 16 days: round melanocyte is seen among elongated and dendritic melanocytes. (G) 19 days: melanocytes are seen around blood vessel. (H) 14 days: melanocytes with long cytoplasmic processes contacting each other. Arrows: round melanocytes; arrowheads: elongated and dendritic melanocytes; bv: blood vessels. HE staining. A-B, inserts C 1-2, F,H: 630x; C: 100x; D,G: 200x; E: 400x.

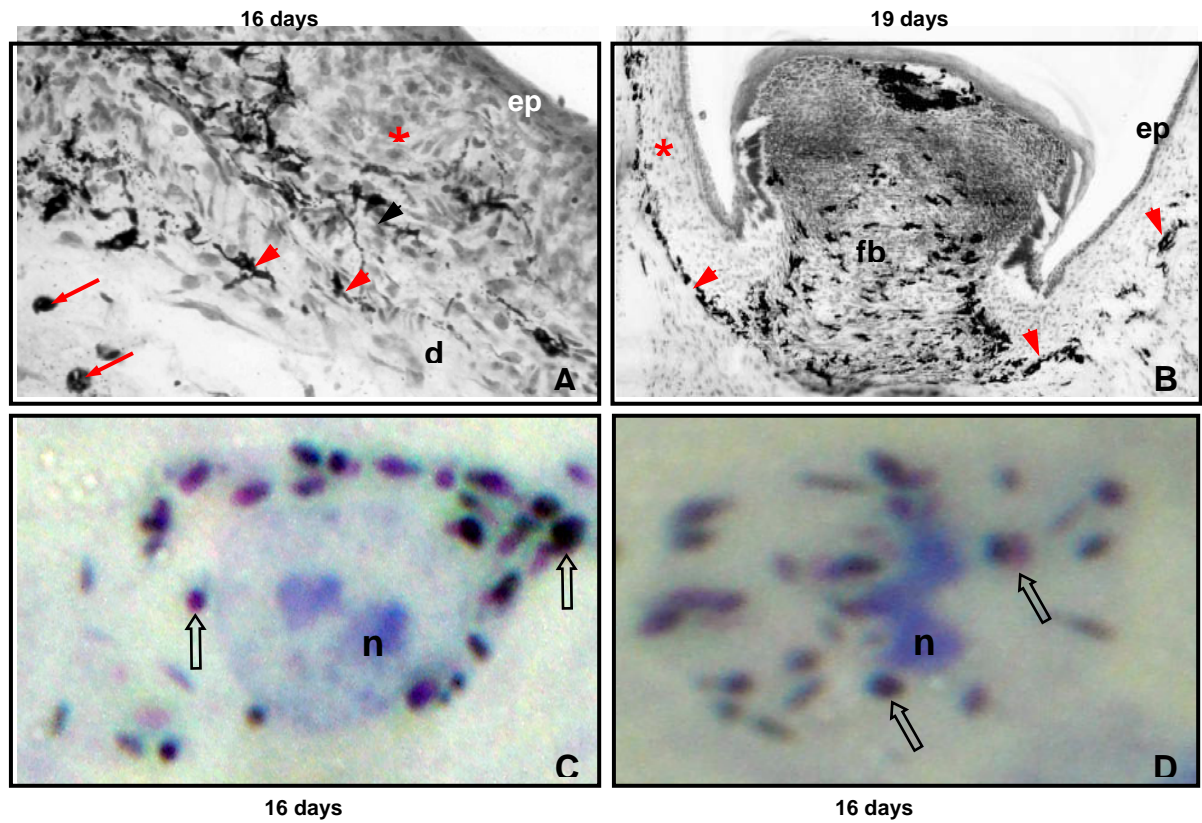


Fig. 4. HE stained sections of skin of Silky embryo. (A) Round melanocytes are seen in the deeper dermis. (A-B) Pigment cells just below the fibers region are elongated, protruding thin cytoplasmic processes. (C-D) Mitosis of melanocytes in maturation with few melanin granules. Arrows: round melanocytes; arrowheads: elongated melanocytes; open arrows: melanin granules; ep: epidermis; d: dermis; \*: fibers region; fb: feather bud; n: nucleus. A: 400x; B: 100x; C-D: 1000x.



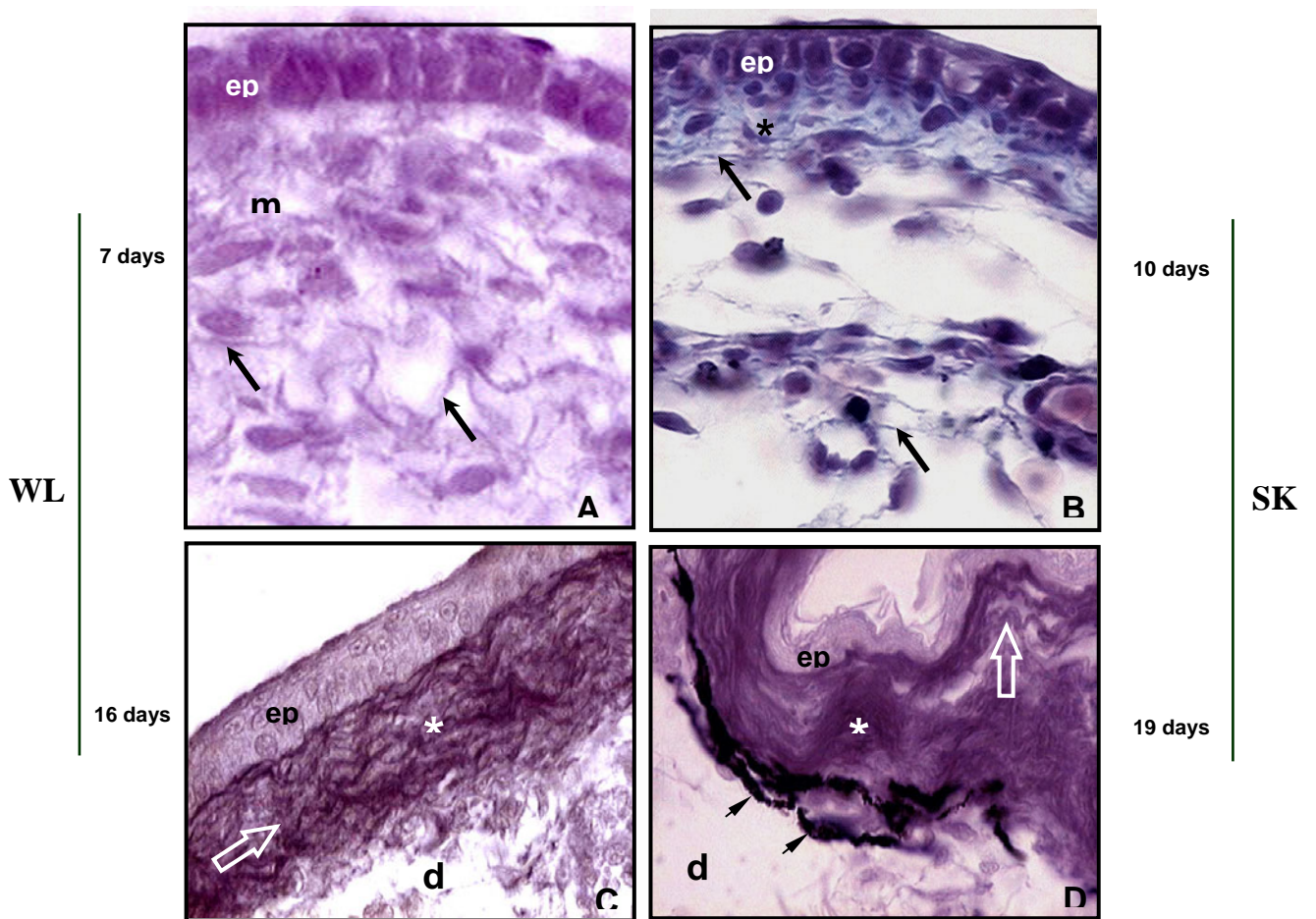


Fig. 5. Relationship between melanocytes and fibers. (A-D) Observe the increased deposition of fibers in superficial dermis during the development of embryos, from thin, short and irregular fibers (A-B) to long, undulated and distributed parallel to the long axis of the epidermis fibers (C-D). (D) Elongated melanocytes are forming a meshwork immediately below the fibers region in Silky embryos. White Leghorn has no pigmentation in the dermis nor epidermis. SK: Silky skin; WL: Leghorn skin; \*: deposition of fibers; arrows: thin, short and irregular fibers; open arrows: long and undulated fibers; arrowheads: elongated melanocytes; ec: ectoderm; m: mesoderm; ep: epidermis; d: dermis. (A, C-D) Weigert's method for elastic fibers; (B) Masson trichome for collagen fibers. A,C-D: 1000x; B: 400x.

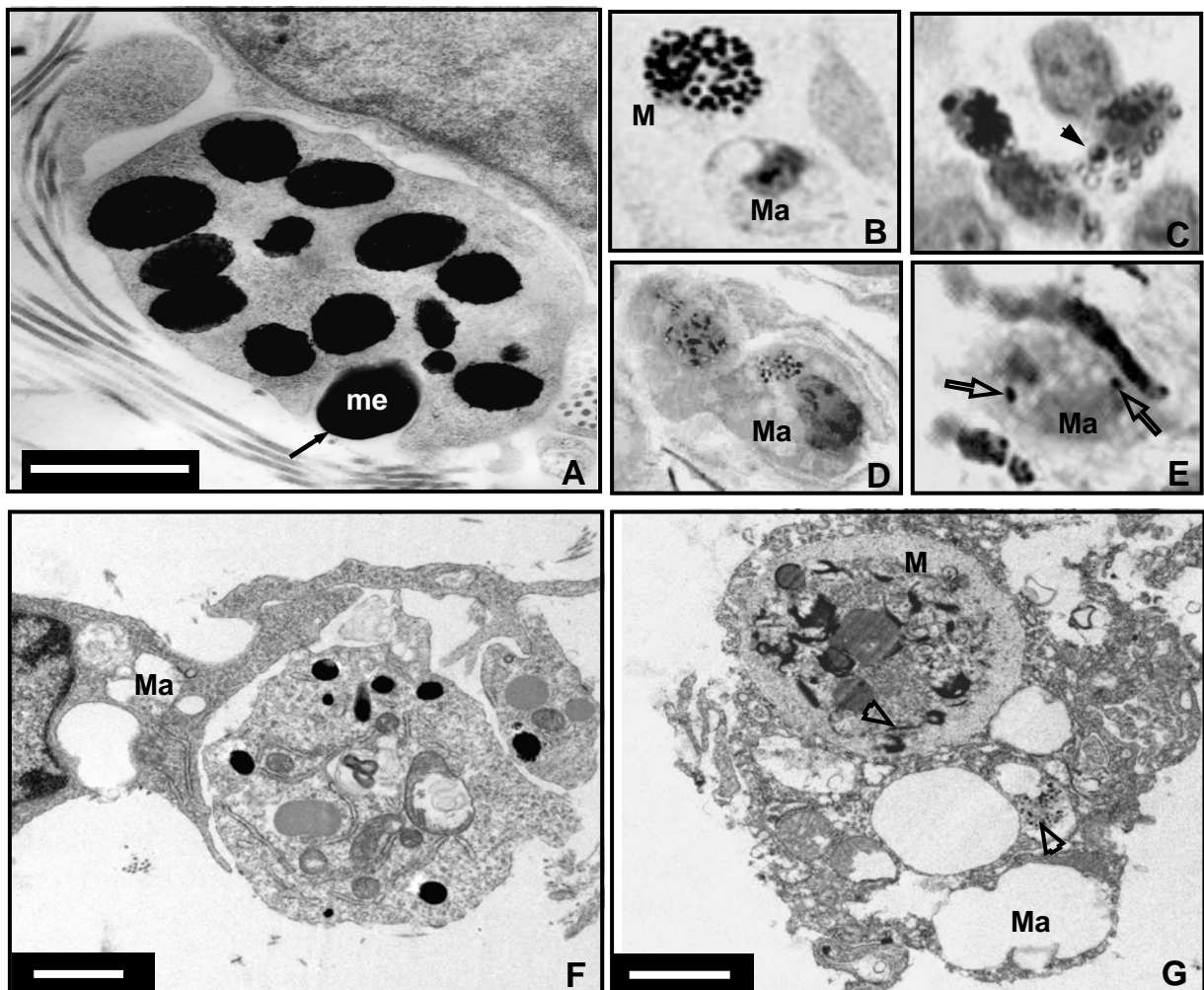


Fig. 6. Dermal skin of Silky embryos. (A) Exocytosis of melanosome. (B) Melanocyte is seen in close proximity to macrophage. (C) Melanosomes lying free in the connective tissue matrix. (D, F) Macrophage is enclosing a piece of melanocyte. (E) Macrophage containing melanin granules. (G) Macrophage with phagocytic vacuole containing debris of melanocyte. M: melanocyte; Ma: macrophage; me: melanosome; arrow: exocytosis of melanosome; arrowhead: melanosomes free; open arrows: macrophage containing melanin granules; open arrowheads: electron opaque products of acid phosphatase reaction. A,F,G: transmission electron microscopy. B-E: light microscopy; HE staining; 200x. A,G: 14-days embryos; B-F: 12-days embryos. Scale bars: 1 $\mu$ m.



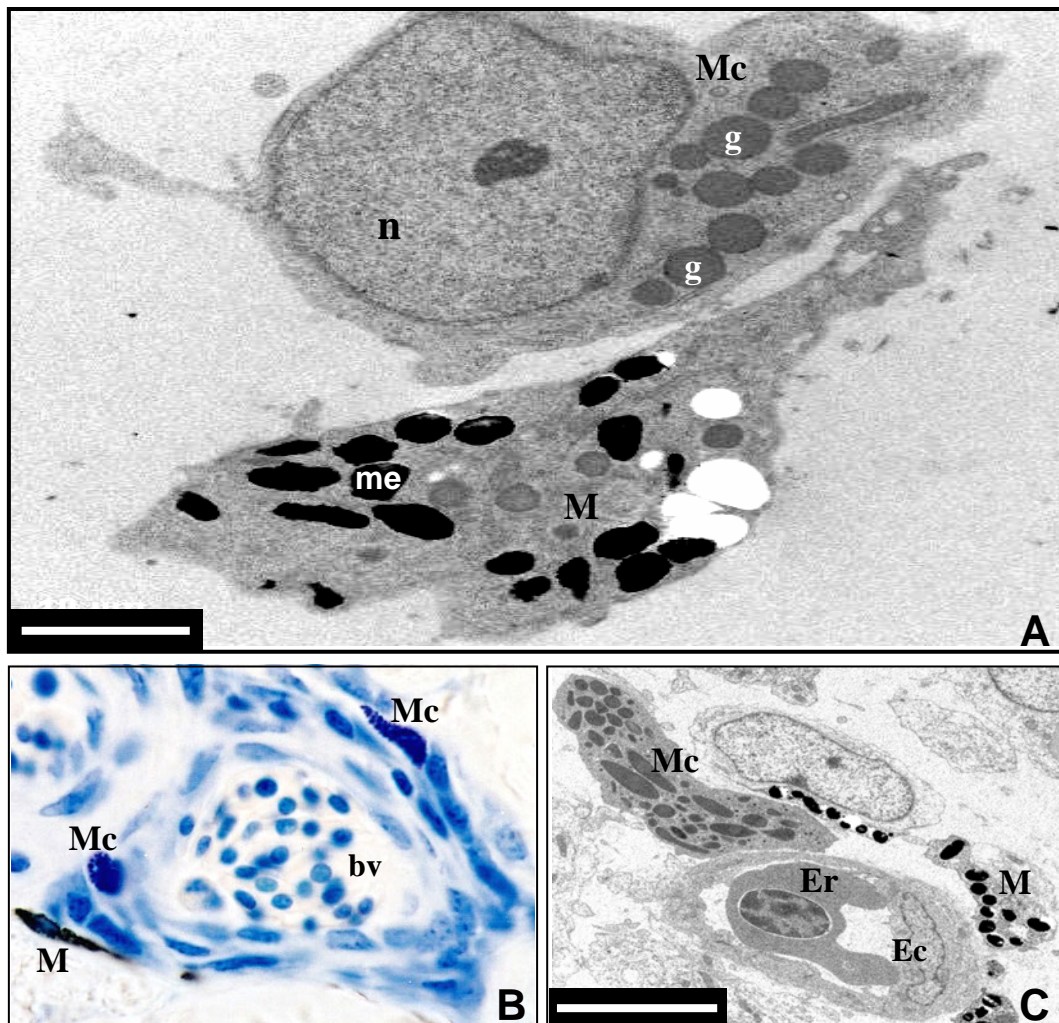


Fig. 7. Dermal skin of 18-days Silky embryos. (A) Electronmicrograph of a mast cell close to a melanocyte. (B) Toluidine blue stained section showing mast cells with metachromatic granules and melanocyte whose melanin granules are characteristically black, both cell types, close to a blood vessel (bv). (C) Electronmicrograph showing mast cell and melanocyte close to a blood vessel. Mc: mast cell; M: melanocyte; me: melanosomes; Er: erythrocyte; Ec, endothelial cell; g: mast cell granules. B: light microscopy; 1000x. Scale bars: A: 10 $\mu$ m; C: 5 $\mu$ m

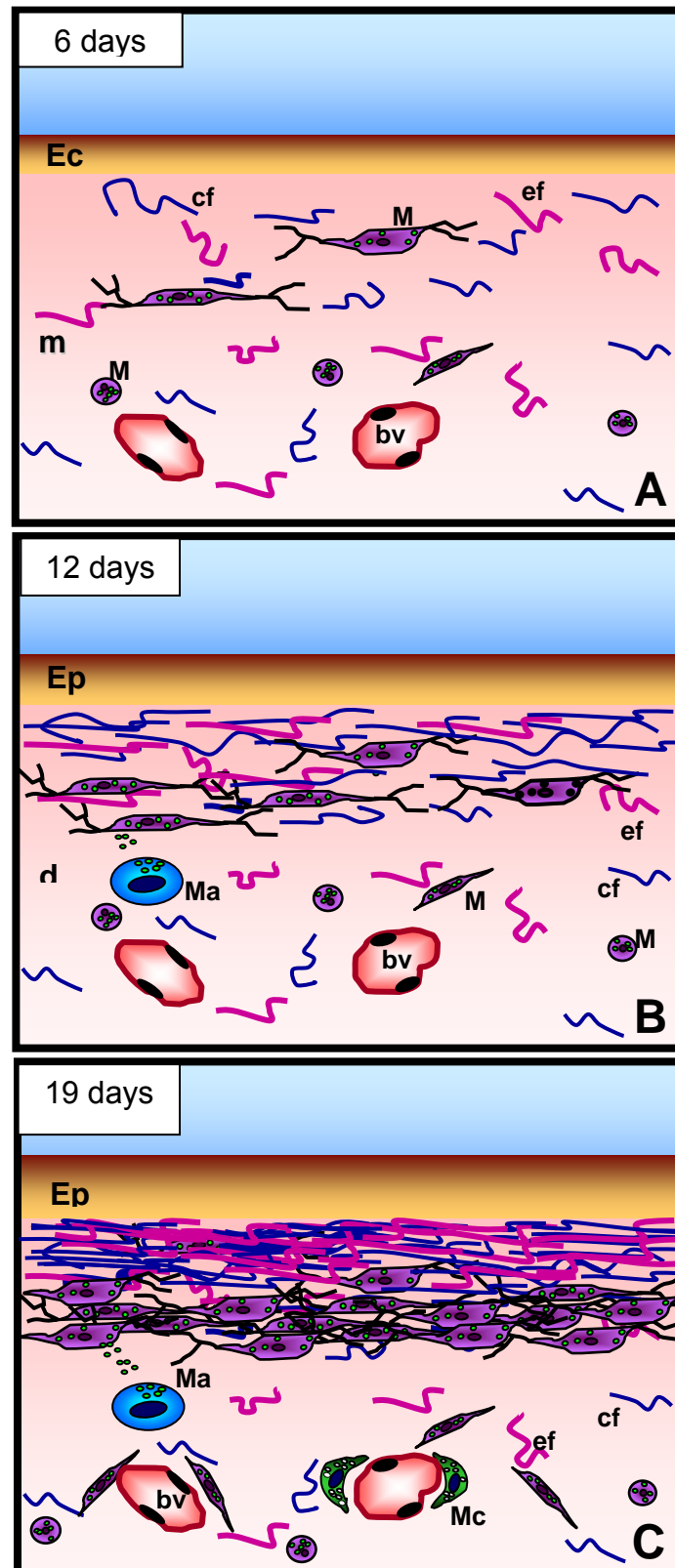


Fig. 8. Schematics summarizing the described results. A-C) Skin of Silky embryos. M: melanocyte; Ma: macrophage; Mc: mast cell; Ec: ectoderm; m: mesoderm; Ep: epidermis; d: dermis; ef: elastic fibers; cf: collagen fibers; blood vessel (bv).

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Dermal melanocytes

In mammals, melanocytes are in the interfollicular epidermis and synthesize melanin in melanosomes that are translocated from perinuclear cytoplasm, along the dendrites to the peripheral tips and then are transferred to surrounding keratinocytes. Once into keratinocytes, melanosomes are translocated to the apical pole of these cells and absorb ultraviolet light (UV) protecting the nucleus from mutagenic damage (Boissy, 2003).

In birds, the epidermal melanocytes are found only in feathers and give them color. But, in some cases, the presence of melanocytes occurs in the dermis as reviewed by Quevedo and Holstein (1998). It is the case of dermal melanophores of lower vertebrates, of dermal melanocytes found throughout the skin during embryonic development and that stay in the glabrous skin of the wild-type mice adult. In the rhesus monkey, almost the whole body skin, but not the hair, is pigmented in a spotted manner. Their epidermal melanocytes are nonmelanotic and patches of dermal melanocytes are scattered throughout the skin. These dermal melanocytes are spindle-shaped, with no particular orientation in the reticular layer (Yun and Montagna, 1966). Dermal melanocytosis includes a variety of pigmented lesions that usually appear at birth or in early childhood and is observed in conditions like naevus of Ota, naevus of Ito and Mongolian spot. Several types of acquired dermal melanocytosis (ADM) can appear in adult life (Hori et al., 1984; Hidano and Kaneko, 1991; Murakami et al., 2005). Histologically, dermal melanocytosis shows melanocytes of various shapes, from dendritic melanocytes scattered in the dermis (Bevona et al., 2003) to aggregations of round to oval melanocytes (Rose et al., 2003). In SK fowl, the presence of melanocytes in the dermis and connective tissues throughout the body was described (Makita and Mochizuki, 1984; Makita and Tsuzuki, 1986; Nozaki and Makita, 1998; Muroya et al. 2000; Faraco et al., 2001). The present study documented the distribution and characterization of melanocytes in White Japanese Silky embryos, compared with White Leghorn, one unpigmented chicken, looking for a role for these cells in the dermis.

## 4.2 Terminal migration of melanoblasts

Various studies have shown the early migratory pathways of melanoblasts in birds (Weston, 1963; Teillet and Le Douarin, 1970; Bronner-Fraser and Fraser, 1988; Reedy et al., 1998a,b; Faraco et al., 2001) but no one referred to the occurrence of these cells in well-developed embryos. We previously (Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001) showed that, in the SK embryo, melanoblast emigrate from the neural tube at stage 18 and by stage 20 start following the dorsolateral as well as the ventral pathways, reaching more ventral regions around the dorsal aorta, the mesonephric kidney and the dorsal mesentery, not occupied by this lineage in WL embryos.

In birds, the localization of melanoblasts was reported by other authors to vary: they can be located in the dermis and migrate into the epidermis between 3 and 4 days (Hulley et al., 1991), lie beneath the epidermis in 4- to 4½-day chick embryos (Bronner-Fraser and Fraser, 1988), or they move dorsolaterally in the dermal mesenchyme increasing in the epidermis from 5-day onward (Teillet and Le Douarin, 1970). We saw melanoblasts, recognized by SI labeling, already in the ectoderm as early as at 3½ days of development (data not shown). The present results show that some SK round and elongated melanoblasts are still located immediately dorsal to neural tube in 6-days embryos, as well as scattered in the mesoderm, in the ectoderm, and still in the dorsolateral and ventral paths. WL melanoblasts are found scattered in the mesoderm, in the ectoderm, and in the dorsolateral path. At 12-13 days, there is an increased number of melanoblasts in SK dermis and epidermis. At 19 days, SK melanoblasts disappear from the epidermis but some are still found in the dermis. This also suggests that the invasion of the epidermis by melanoblasts is no longer occurring, and that the epidermal population gradually disappears. In WL the number of melanoblasts in the dermis is progressively reduced until they disappear in the 10-days embryo; the epidermal melanoblasts are seen until 13-day. Why do SK melanoblasts survive in the dermis while epidermis is unable to provide appropriate conditions to melanoblasts survival? Previous works suggested that the mesodermal distribution of melanoblasts in SK occurs because there are environmental factors that direct the homing of these cells to abnormal sites (Hallet and Ferrand, 1984; Reedy et al., 1998a; Faraco et al., 2001; Freitas et al., 2003, Freitas et al., 2006) and that support their proliferation and differentiation (Lecoin et

al., 1995). Until now there is no direct evidence of a factor controlling the survival of melanocytic lineage cells in SK.

#### 4.3 Melanocyte differentiation in the dermis is a continuous process in SK embryos

Melanin deposition evidences melanocyte differentiation. Usually, in chick, melanocyte differentiation occurs in the epidermis (Dorris, 1939; Hopkins-Fox, 1949; Le Douarin, 1982) or sometimes first in the dermis and then in the epidermis (Hulley et al., 1991). In SK embryos, some pigment cells in maturation, i.e. SI-positive plus mature granules, are seen scattered in the dermis and near the blood vessels until 19-days of incubation. It means that these melanocytes are still undergoing the melanogenic process because the primary target of the autoantibodies in SI serum is the enzyme TRP-1 (Austin and Boissy, 1995) that has a role in melanin production (Hearing and Tsukamoto, 1991). It is interesting to note that the SI labeling is present not only in the pigment cells body but in their cytoplasmic processes too, suggesting that immature melanosomes are localized in both regions of the cells. In epidermal melanocytes, melanogenesis is reported to occur only in the cell body (Orlow, 1998). In adult rhesus monkey, Yun and Montagna (1966) suggested that the dermal melanocytes might represent static cells. Inactive immature melanocytes with few mature melanosomes are found in healthy human dermis near pigmentation lesions (Hori et al., 1984; Mizushima et al., 1998). The presence of immature melanocytes in the dermis of SK embryos might indicate that there is a population of cells that can maintain the lineage throughout development.

In a previous study we described, at earlier stages (3 to 5½,-days), proliferation of melanoblasts in the SK embryo that was not found in Lightbrown Leghorn nor in WL (Faraco et al., 2001). In this work, we found proliferative immature melanocytes, recognized by mitotic nuclei in cells containing some melanin granules, in well-developed embryos, as at 16-19 days of incubation. Although we tried in different ways, we did not succeed the simultaneous labeling with SI and BrdU (bromodeoxyuridine) never worked. That is the reason why we rely on light microscopy mitosis images to access proliferation. We suggest that the melanocytic lineage is maintained in SK embryos by sustained proliferation of melanoblasts or immature melanocytes. Our hypothesis is supported by results from Lecoin and

coworkers (1994) who showed that embryo extract from day-9 SK embryos enhances proliferation of quail neural crest cells in culture, suggesting that SK environment might contain proliferative factors not present in other strains. But these mitogenic factors are yet unknown.

When mature melanocytes appear later in the dermis they are considered as ectopic and transitory (Le Douarin, 1982) but the SK dermal melanocytes ectopically distributed in the dermis are permanent. Hulley and coworkers (1991) showed that melanocyte differentiation occurs first in dermis than epidermis and that pyknotic dermal melanocytes were seen from 8-day onward, in the New Hampshire Red/Black Australorp crossbreed. This situation does not happen in SK in which pigment cell differentiation occurs in the dermis, as fully differentiated pigment cells were never seen in the interfollicular epidermis, and the dermal population survives until adulthood. Melanoblasts seem to differentiate transiently in the feather bud of the White SK, but at hatching all epidermal pigment has disappeared (our own observations).

The first appearance of fully differentiated SK melanocytes described previously was in the vicinity of the sinus of uncalcified cranial bone at 6½ to 8 days and these cells had small number of granules and only few cytoplasmic processes (Makita and Tsuzuki, 1986). We observe few pigment cells containing melanin granules that are faintly melanized in the 6-days dermis and at 7-days they acquire more melanized granules. Hulley and coworkers (1991) showed that the New Hampshire Red/Black Australorp crossbreed exhibits the first dermal melanocytes at 5-days of incubation, 2½ to 4 days earlier than is found for other birds (Dorris, 1939; Weston, 1963; Le Douarin, 1982). Between 8-10-days of incubation, Makita and Tsuzuki (1986) localized SK pigment cells which were rounded or with a few cytoplasmic processes in almost the whole area of the connective tissue covering uncalcified cranial bone. At the same stage, but in other regions of the embryo, they found pigment cells that had many granules and long cytoplasmic processes. At 10-days of incubation we can clearly see, at naked eye, SK pigmentation in the feather bud where they are more concentrated, while only scattered cells are seen in the interfollicular skin, as also reported by Eastlick and Wortham (1946). From 14-days, the embryo displays the characteristic aspect of White Japanese Silky chicken: black skin with white feathers. It is possible to note, sometimes, a light brown coloration of

the feathers that disappears with the time, probably due to degeneration or death of the melanocytes in a process that can be similar to the described in WL in which occurs a genetically determined programmed cell death that causes melanocytes to degenerate before the melanin can be deposited in the feathers (Jimbow et al., 1974).

Melanocytes varied in shape at various stages of development. Reams (1956) demonstrated that for a pigment cell to become a dendritic melanocyte it is required to pass through the brief intermediate stage of a spherical melanoblast that is capable of division. Melanocytes are considered mature cells when they branch and the cessation of cell division occurs, prior to the onset of melanogenesis (Reams, 1956). We saw in SK embryos, melanocytes with few mature granules in mitosis. In SK dermis we found round and elongated pigment cells at all studied stages of development. Round melanocytes are seen among elongated and dendritic melanocytes in distended samples, as a result of the method, that brings together different layers of the dermis. Thus, attention must be paid to the method used when describing localization and arrangement of the cells. In sectioned samples, we note that round cells are actually in the deeper layers of the dermis, while the ones closer to the epidermis are elongated. The mitotic cells we saw were round, but contained some mature melanin granules, a sign that melanogenesis was already occurring. The presence of these cells in deeper layers of the dermis might suggest that special microenvironmental regions could be responsible for the maintenance of the proliferative potential of the lineage and that differentiating cells would move to occupy the region below the fibers. In this region the mature cells assume an arrangement in which they seem to establish close contact to each other. From 12 through 19-days of incubation we found elongated melanocytes that form a diffuse mesh in the dermis and around blood vessels. The same localization of melanocytes in the vicinity of blood vessels was also described in many SK embryonic organs (Makita and Tsuzuki, 1986), in adult SK (Makita and Mochizuki, 1984; Muroya et al., 2000; Faraco et al., 2001; Nishimura et al., 2006), and in adult rhesus monkey (Yun and Montagna, 1966). Branched melanocytes are found around blood vessels and dense capillary beds within the coelomic lining of the Black Langshan fowl too (Reams et al., 1959). The capacity of melanoblasts and melanocytes to cross blood vessels walls and basement membrane was suggested when they were injected into

the bloodstream and got to the epidermis (Weiss and Andres, 1952). In spite of the various techniques used in this work, we never saw melanoblasts or melanocytes inside blood vessels.

Other interesting topics are the localization and the presence of melanocytes in superficial dermis. As the elastic and collagen fibers are being deposited close to the epidermis, the pigment cells seem to be segregated from this region, and usually are found just below the fibers, where they appear to contact each other through their cytoplasmic processes. The presence of the fibers and cells (fibroblasts) might be responsible for preventing the melanoblasts and melanocytes from invading the epidermis at these late stages. Rarely, melanocytic lineage cells can be seen in the fibers layer, and usually no one is seen just below the epidermis. In figures 1B and 5D it is quite evident the distance between melanoblasts and melanocytes, respectively, in the dermis and the overlying epidermis already populated by SI positive cells. An extracellular sheath, maybe of collagen-fiber origin (Hori et al., 1982), is described around dermal melanocytes in Mongolian spot (Okawa et al., 1979), in the nevus of Ota (Hori et al., 1982) and Ito (Okawa et al., 1979). It was suggested that the extracellular sheath could give stability to melanocytes in the dermis (Hori et al., 1982) and to be essential for dermal melanocytes survival (Okawa et al., 1979). The relationship between elastic fibers and dermal melanocytes was found in dermal melanocytosis and cynomolgus macaques (Ono et al., 1985). We never saw an extracellular sheath involving SK dermal melanocytes nor relationship between fibers and these cells. Some round and elongated melanocytes are scattered throughout the dermis but they usually have the appearance of elongated melanocytes with long and ramified cytoplasmic processes that form a diffuse mesh below the collagen and elastic fibers in superficial dermis. Epidermal melanocytes dendrites are important to supply a way for melanosome trafficking and transfer to keratinocytes (Jimbow and Sugiyama, 1998). Why do SK dermal melanocytes have this complex branching network of dendrites contacting each other, when no evidence of direct transference between cells could be found? This is intriguing specially when we could easily extract, during processing, the meshwork of melanocytes, as an assemble of threads, free of the surrounding tissues (data not shown). This suggests a close interaction between dermal melanocytes, and points



to the need of investigating the presence of adhesion structures and/or molecules in these cells, that might be involved with special roles the cells can have.

#### 4.4 Relationship between melanocytes and other cells of the dermis

We observed, in older SK embryos (16-19days), the close proximity of macrophages and mast cells to melanocytes. Usually, melanosomes are packed in the cytoplasm of melanocytes but it is necessary their transfer from melanocytes to keratinocytes to produce skin or feather pigmentation. Some diffuse melanin pigments were observed in the SK perimysium (Nishimura et al., 2006) but the authors did not know whether they were eliminated by exocytosis from melanocytes or were degraded melanocytes. We note the exocytosis of melanosomes and that the melanin granules lying free in the connective tissue matrix were engulfed by macrophages as well as debris of melanocyte's cytoplasm. Macrophages showed positive reaction to AcPase that is a widely accepted lysosomal marker (Novikoff, 1963). Dermal macrophages laden with melanin can be defined as melanophages (McGovern et al., 1973). These cells are present in biopsies of normal human skin but an increase is observed in facial skin of patients with melasma (Grimes et al, 2005), and in dermis of persons with nevus of Hori in smaller numbers than melanocytes (Murakami et al., 2005). In SK embryos, probably melanophages are performing just the physiological function of removing free granules and debris of apoptotic melanocytes. Apoptosis might as well represent a normal, controlled process in the removal of damaged cells. The function or reason for the release of melanin granules by melanocytes still needs to be investigated.

Some evidences suggest the interaction between mast cells and some resident cells of connective tissue, like fibroblasts (Atkins et al., 1985; Abe et al., 1998), and dermal dendrocytes (Sueki et al., 1993; Monteiro et al., 2000) but little is know about the relationship between mast cells and melanocytes. The proximity of both cells was seen in the skin of mice of several different genotypes (Quevedo JR et al., 1968), in human pathological cases as atopic dermatitis (AD)-associated acquired symmetrical dermal melanocytosis (ASDM) lesions (Murakami et al., 2005) or blue nevi, intradermal nevi, urticaria pigmentosa among others (Okun, 1965). Occasionally we found melanocytes close to mast cells in the dermis of SK embryos

at latter stages, while in WL embryos mast cells had no relationship with other cells. No cells containing both metachromatic and melanin granules are observed in the dermis of SK, so it is unlikely that transference of granules between them might occur. Mast cells and their factors increase fibroblast proliferation and collagen synthesis (Abe et al., 1998; Riekkki et al., 2004) and contribute to biosynthetic changes in dermal dendrocytes (Monteiro et al., 2000). Two products secreted by mast cells (stem cell factor and histamine) stimulate melanocyte growth, differentiation and melanin synthesis (Okura et al., 1995; Ito et al., 1999; Yoshida et al., 2002). It was suggested that the effects of these factors also acted in a systemic manner because in patients with atopic dermatitis the serum levels of both molecules are elevated and correlate with the disease severity (Kanbe et al., 2001; Imatzumi et al., 2003). Further studies are required to disclose the direct interaction between mast cells and melanocytes because we never saw degranulated mast cell near melanocytes. So, the role of the interaction between dermal mast cells and melanocytes remains an interesting subject to be elucidated.

#### 4.5 Possible functions of dermal melanocytes

The melanin pigment has various roles, like camouflage and adornment (melanophoros), acts as a thermoregulation system, or can contribute to detoxification and to prevent UV damage by binding iron and other metals in the skin (Césarini, 1996). Epidermal melanocytes could be involved in the neutralization of toxic oxygens generated during inflammatory processes, using those molecules in melanin production (Nordlund et al., 1989) and even acting as phagocytes against microorganisms (Le Poole et al., 1993). Mammalian melanocytes have other roles not linked to melanin, because they are important modulators of inflammation and synthesize some growth factors and cytokines (Nordlund, 1992). After all, which can be the role of dermal melanocytes in Silky chicken? The SK fowl is a very special breed, admired throughout the world for the silky appearance of its feathers and being even used as a pet for its calm behavior. They are very resistant animals and have very uncommon characteristics. Many works described the SK (Nozaki and Makita, 1998; Muroya et al., 2000) and their eggs (Koketsu and Toyosaki, 2004; Toyosaki and Koketsu, 2004) pointing to their value as healthy food and to their

medicinal properties. Besides being good eggs producers, SK chickens are very resistant birds, usually healthy, seldom attacked by common bird diseases (our own observations). Is it possible that the melanin content of their tissues would give them some kind of protection? It was suggested that melanin in melanocytes and keratinocytes function as part of the innate immune system (Mackintosh, 2001). Ishikawa and coworkers (2000) showed that pigmented rabbits were more resistant to the effects of the botulinum toxin when compared to albino rabbits because this toxin bound to melanin. The role of UV damage protection exerted by epidermal melanocytes is not likely to be performed by the dermal melanocytes in SK, as they are in deeper layers and the skin is covered by the feathers. Unknown physiological functions of the melanocytes might be related with the presence of the huge melanocytic population in the dermis and internal organs in the SK, and analysis of all the microenvironmental situations as well as of the secreted factors involved and the relationship with other cells types will be the focus of our future investigations.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. R. Boissy for the gift of Smyth-line serum; Dr. Carol Ann Erickson for providing many of the reagents; Laboratório de Patologia Experimental, PUCPR, for the use of Image Pro Plus Caption Software; and Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR, for the use of electron microscopy equipments.

**LITERATURE CITED**

- Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Kido H. 1998. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy* 28:1509-1517.
- Atkins FM, Friedman MM, Rao PVS, Metcalfe DD. 1985. Interactions between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. *Int Arch Allergy Appl Immun* 77:96-102.
- Austin LM, Boissy RE. 1995. Mammalian tyrosinase related protein-1 is recognized by autoantibodies from vitiliginous Smyth chickens. *Am J Pathol* 146:1529–1541.
- Bevona C, Tannous Z, Tsao H. 2003. Dermal melanocytic proliferation with features of a plaque-type blue nevus and neurocristic hamartoma. *J Am Acad Dermatol* 49: 924-929.
- Boissy R. 2003. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol* 12:5–12.
- Bronner-Fraser M, Fraser SE. 1988. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335:161-164.
- Césarini JP. 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Adv Space Res* 18:35-40.
- Dorris F. 1936. Differentiation of pigment celss in tissue cultures of chick neural crest. *Proc Soc Exp Biol Med* 34:448-449.
- Dorris F. 1939. The production of pigment by chick neural crest in grafts to the 3-day limb bud. *J Exptl Zool* 86:315-345.
- Drury RAB, Wallington EA. 1980. *Carleton's Histological Technique*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press.
- Eastlick HL, Wortham RA. 1946. An experimental study on the feather pigmentation and subcutaneous melanophores in the Silky Fowl. *J Exp Zool* 103:233-258.
- Erickson CA, Duong TD, Tosney KW. 1992. Descriptive and experimental analysis of the entry into ectoderm in the chick embryo. *Dev Biol*, 151:251-272.
- Faraco CD, Vaz SA, Pastor MV, Erickson CA. 2001. Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. *Dev Dyn* 220:212-225.

- Freitas PF, Ferreira FF, Faraco CD. 2003. PNA-positive glycoconjugates are negatively correlated with the access of neural crest cells to the gut in chicken embryos. *Anat Rec* 273A:705-713.
- Freitas PF, Borges ME, Ferreira FF, Erickson CA, Faraco CD. 2006. The distribution of ephrins and PNA-positive glycoconjugates are correlated with atypical melanoblast migration in Silky chicken embryos. Manuscript in preparation.
- Gomori G. 1952. *Microscopic Histochemistry: Principles and practice*. Chicago: University of Chicago Press. p 189-194.
- Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. 2005. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 27:96-101.
- Hallet MM, Ferrand R. 1984. Quail melanoblast migration in two breeds of fowl and in their hybrids: evidence for a dominant genic control of the mesodermal pigment cell pattern through the tissue environment. *J Exp Zool* 230:229–238.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stage in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 5:2902–2909.
- Hidano A, Kaneko K. 1991. Acquired dermal melanocytosis of the face and extremities. *Br J Dermatol* 124:96-99.
- Hopkins-Fox M. 1949. Analysis of some phases of melanoblast migration in the Barred Plymouth Rock embryos. *Physiol Zool* 22:1-22.
- Hori Y, Ohara, Y, Niimura M, Kukita A. 1982. A. Electron microscopy. Ultrastructural observations of the extracellular sheath of dermal melanocytes in the nevus of Ota. *Am J Dermatopathol* 4:245-251.
- Hori Y, Kawashima M, Oohara K, Kukita A. 1984. Acquired, bilateral nevus of Ota-like macules. *J Am Acad Dermatol* 10:961-964.
- Hulley PA, Stander CS, Kidson SH. 1991. Terminal migration and early differentiation of melanocytes in embryonic chick skin. *Dev Biol* 145:182-194.
- Imatzumi A, Kawakami T, Murakami F, Soma Y, Mizoguchi. 2003. Effective treatment of pruritus in atopic dermatitis using H1 antihistamines (second-generation antihistamines): changes in blood histamine and tryptase levels. *J Dermatol Sci* 33:23-29.

- Ishikawa H, Mitsui Y, Yoshitomi T, Mashimo K, Aoki S, Mukuno K, Shimizu K. 2000. Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response of albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Jpn J Ophthalmol* 44:106-109.
- Ito M, Kawa Y, Ono H, Ocurra M, Baba T, Kubota Y, Nishikawa S-I, Misoguchi M. 1999. Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors. *J Invest Dermatol* 112:796-801.
- Jimbow K, Szabo G, Fitzpatrick TB. 1974. Ultrastructural investigation of autophagocytosis of melanosomes and programmed death of melanocytes in White Leghorn feathers: a study of morphogenetic events leading to hypomelanosis. *Dev Biol* 36:8-23.
- Jimbow K, Sugiyama S. 1998. Melanosomal translocation and transfer. In: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. JJ Nordlund, RE Boissy, VJ Hearing, RA King, and JP Ortonne (eds). New York: Oxford University Press, p.107-114.
- Kanbe N, Kanbe M, Kochan JP, Schwartz LB. 2001. Human skin-derived mast cells can proliferate while retaining their characteristic functional and protease phenotypes. *Blood* 97:2045-2052.
- Kitamura K, Takiguchi-Hayashi K., Sezaki M, Yamamoto H, Takeuchi T. 1992. Avian neural crest cells express a melanogenic trait during early migration from the neural tube: observations with the new monoclonal antibody, "MEB-1". *Development* 114:367-378.
- Koketsu M, Toyosaki T. 2004. Nutritive constituents of Silky fowl eggs: comparison with hen eggs of White Leghorn origin. *Animal Science Journal* 75:67-69.
- Lecoin L, Mercier P, Le Douarin NM. 1994. Growth of neural crest cells in vitro is enhanced by extracts from Silky Fowl embryonic tissues. *Pigment Cell Res* 7:210-216.
- Lecoin L, Lahav R, Martin FH, Teillet MA, Le Douarin NM. 1995. Steel and c-kit in the development of avian melanocytes: A study of normally pigmented birds and of the hyperpigmented mutant Silky fowl. *Dev Dyn* 203:106-118.
- Le Douarin NM. 1982. *The Neural Crest*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.

- Le Douarin NM, Teillet, M. 1974. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* 41:162–184.
- Le Poole IC, Mutis T, Van Den Wijngaard RM, Westerhof W, Ottenhoff T, De Vries RP, Das PK. 1993. A novel antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol* 151:7284-7292.
- Mackintosh JA. 2001. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J Theor Biol* 211:101-113.
- Makita T, Mochizuki S. 1984. Distribution of pigment cells in tissues of Silky fowl. I. Light microscopic observations. *Yamaguchi J Vet Med* 11:17–38.
- Makita T, Tsuzuki Y. 1986. Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl. II. Embryological survey. *Yamaguchi J Vet Med*, 13:11–20.
- McGovern VJ, Russel P, Riley V. 1973. Mechanisms in Pigmentation. Proceedings of the 8th International Pigment Cell Conference. S.Karger-Basel, Switzerland.
- Mizushima J, Nogita T, Higaki Y, Horikoshi T, Kawashima M. 1998. Dormant melanocytes in the dermis: do dermal melanocytes of acquired dermal melanocytosis exist from birth? *Br J Dermatol*, 139:349-350.
- Monteiro MR, Murphy EE, Galaria NA, Whitaker-Menezes D, Murphy GF. 2000. Cytological alterations in dermal dendrocytes in vitro: evidence for transformation to a non-dendritic phenotype. *Br J Dermatol* 143:84-90.
- Murakami F, Soma Y, Mizoguchi M. 2005. Acquire symmetrical dermal melanocytosis (naevus of Hori) developing after aggravated atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 152:903-908.
- Muroya S, Tanabe RI, Nakajima I, Chikuni K. 2000. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the Silky fowl. *J Vet Med Sc* 62:391–395.
- Nishimura S, Oshima I, Ono Y, Tabata S, Ishibashi A, Iwamoto H. 2006. Age-related changes in the intramuscular distribution of melanocytes in the Silky fowl. *Br Poultry Sc*, 47:426-432.
- Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA, Boissy RE, Rheins LA. 1989. Pigment Cell Biology: an historical review. *J Invest Dermatol* 92: 53S-60S.
- Nordlund JJ. 1992. The pigmentary system and inflammation. *Pigment Cell Res* 5:362-365.

- Novikoff AB, 1963. Lysosomes in the physiology and pathology of cells: contributions of staining methods. In: Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, A.V.S. de Reuck and M.P. Cameron (eds). Boston: Little Brown and Co. p.36-73.
- Nozaki A, Makita T. 1998. The surface color measurement of major tissues of Silky fowls and White Leghorns. *J Vet Med Sc* 60:489–493.
- Okawa Y, Yokota R, Yamauchi A. 1979. On the extracellular sheath of dermal melanocytes in nevus fuscoceruleus acromiodeltoideus (Ito) and Mongolian spot. An ultrastructural study. *J Invest Dermatol* 73:224-230.
- Okun M. 1965. Histogenesis of melanocytes. *J Invest Dermatol* 44:285- 299.
- Okura M, Maeda H, Nishikawa S, Mizoguchi M. 1995. Effects of monoclonal anti-*c-kit* antibody (ACK2) on melanocytes in newborn mice. *J Invest Dermatol* 105:322-328.
- Ono T, Mah K, Hu, F. 1985. Dermal melanocytes and elastic fibers. *J Cut Pathol* 12:468-475.
- Orlow SJ. 1998. The biogenesis of melanosomes. In: *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology*. JJ Nordlund, RE Boissy, VJ Hearing, RA King, and JP Ortonne (eds). New York: Oxford University Press. p 97-106
- Quevedo Jr. WC, Lewis YS, Smith DE. 1968. On the relationship of mast cells and melanocytes. *J Invest Dermatol* 30:133-136.
- Quevedo Jr WC, Holstein TJ. 1998. General biology of Mammalian Pigmentation. In: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. JJ Nordlund, RE Boissy, VJ Hearing, RA King, and JP Ortonne (eds). New York: Oxford University Press, p. 43-58.
- Reams Jr WM. 1956. An experimental study of the development of pigment cells in the coelomic lining of the chick embryo. *J. Morphol* 99:513-547.
- Reams Jr WM, Nichols, SE, Hager, HG. 1959. Chemical evocation of melanocyte branching in the chick embryo. *Anat Record* 134:667-676.
- Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. 1998a. The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Dev Biol* 200:234-246.
- Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. 1998b. Specification and migration of melanoblast at the vagal level and in hyperpigmented silkie chickens. *Dev Dyn* 213:76-485.



- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Riekkari R, Harvima IT, Jukkola A, Risteli J, Oikarinen A. 2004. The production of collagen and the activity of mast-cell chymase increase in human skin after irradiation therapy. *Exp Dermatol* 13:364-371.
- Rose C, Kaddu S, Fouad El-Sherif T, Kerl H. 2003. A distinctive type of widespread congenital melanocytic nevus with large nodules. *J Am Acad Dermatol* 49:732-5.
- Smyth Jr JR. 1990. Genetics of plumage, skin and eye pigmentation in chickens. *Dev Animal Vet Sc* 22:109–167.
- Spurr, AR. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31-43.
- Sueki H, Whitaker D, Buchsbaum M, Murphy GF. 1993. Novel interactions between DDs and mast cells in human skin. Implications for hemostasis and matrix repair. *Lab Invest* 69:160-172.
- Teillet MA, Le Douarin NM. 1970. La migration des cellules pigmentaires etudiee par la methode des greffes heterospecifiques de tube nerveux chez l'embryon d'oiseau. *C R Acad Sci* 270:3095-3098.
- Toyosaki, T, Koketsu, M. 2004. Oxidative stability of Silky fowl eggs. Comparison with hen eggs. *J Agric Food Chem* 52:1328-1330.
- Weiss P, Andres G. 1952. Experiments on the fate of embryonic cells (chick) disseminated by the vascular route. *J Exp Zool* 270:273-284.
- Weston JA. 1963. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev Biol* 6:279-310
- Yoshida M, Hirotsu S, Nakahara M, Uchiwa H, Tomita, Y. 2002. Histamine is involved in ultravioleta B induced pigmentation of guinea pig skin. *J Invest Dermatol* 118:255-260.
- Yun JS, Montagna W. 1966. The melanocytes in the epidermis of the rhesus monkey (*Macaca maculatta*). *Anat Rec* 154:161-174.

## **CAPÍTULO 3**

### **ETAPAS DA MELANOGÊNESE EM MELANÓCITOS DERMAIS DE EMBRIÕES DE GALINHA SEDOSA JAPONESA**

C.F. ORTOLANI-MACHADO\*, P.F. de FREITAS e C.D. FARACO

**ETAPAS DA MELANOGÊNESE EM MELANÓCITOS DERMIS DE  
EMBRIÕES DE GALINHA SEDOSA JAPONESA**

C.F. ORTOLANI-MACHADO\*, P.F. de FREITAS e C.D. FARACO

Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular,  
UFPR, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, Brazil.

Email: \* [cfom@ufpr.br](mailto:cfom@ufpr.br)

Tel: 55- 41- 30149877

Fax: 55- 41- 32321924

TÍTULO ABREVIADO:

ORTOLANI-MACHADO et al. – Melanogênese na SK

## RESUMO

A galinha Sedosa Japonesa (SK) possui uma hiperpigmentação na derme e no tecido conjuntivo de vários órgãos internos. Neste trabalho foram caracterizados, ultraestruturalmente, os grânulos de melanina em desenvolvimento nos melanócitos dermais da pele dorsal da SK para melhor compreender o processo da melanogênese nestas células permanentemente ectópicas. Nestes melanócitos, os melanossomas passam pelos mesmos estágios de amadurecimento encontrados nos melanócitos epidermais, isto é, do estágio I ao IV. Este evento acontece tanto no corpo celular quanto nos prolongamentos citoplasmáticos. No estágio III observa-se deposição de melanina em um conjunto principal e em estruturas arredondadas, que parecem coalescer para compor o grânulo maduro. As etapas do processo de melanogênese nos melanócitos dermais de SK são similares aos melanócitos epidermais. O destino final dos melanossomas maduros é desconhecido, porém observa-se que grânulos exocitados no meio extracelular são fagocitados por macrófagos dermais. Apesar da proximidade dos melanócitos com outras células presentes na derme, não foi evidenciada a transferência de melanossomas entre eles.

**PALAVRAS-CHAVE:** melanossoma, melanina, ultraestrutura.

## 1. INTRODUÇÃO

Os melanócitos são células pigmentares cujos precursores, os melanoblastos, derivados da crista neural, se desprendem da porção dorsal do tubo neural (Le Douarin, 1982) e migram através do mesênquima do embrião em desenvolvimento até atingir seus sítios específicos, onde se diferenciam em células produtoras de melanina.

Os melanossomas são vesículas intracelulares especializadas na síntese de melanina, um pigmento complexo que está envolvido na fotoproteção da pele, uma vez que absorve e dispersa a luz, além de reduzir os tipos reativos de oxigênio. Eles podem ser elípticos ou esféricos, dependendo do tipo de melanina presente em seu interior, eumelanina e feomelanina, respectivamente (Slominski et al., 2003). A biogênese dos melanossomas tem sido estudada por meio de várias técnicas como microscopia eletrônica, histoquímica, bioquímica e imunocitoquímica. Com o uso destas técnicas foi proposta uma relação de eventos para explicar a melanogênese: a) as proteínas estruturais e enzimáticas dos melanossomas são sintetizadas de acordo com um programa genético; b) estas proteínas são processadas pelo retículo endoplasmático (RE) e Complexo de Golgi (CG) e se acumulam em vesículas esféricas provenientes do RE liso (REL), os melanossomas no estágio I, que corresponde ao início da organização da matriz; c) materiais proteínáceos, lamelas incompletas e pequenas estruturas vesiculares aparecem dentro da vesícula no estágio I, que com o desenvolvimento se torna elíptica e com uma matriz já organizada, porém sem a formação de melanina (estágio II). No estágio III ocorre a deposição de melanina eletrondensa nas lamelas organizadas e finalmente no estágio IV os melanossomas estão totalmente escuros e preenchidos com melanina (Slominski et al., 2003).

Foi sugerido que a biogênese dos melanossomas seguia o mesmo caminho dos lisossomas (Novikoff et al., 1968), pois as duas organelas possuem várias características em comum (Orlow, 1995; Dell'Angelica et al., 2000), como a formação de compartimentos ácidos e a presença da proteína de membrana associada ao lisossoma (LAMP). Porém, Raposo e colaboradores (2001) sugeriram que os melanossomas são diferentes dos lisossomas pois a atividade da fosfatase ácida foi detectada somente em células alteradas (Seiji e Kikuchi, 1969), estando

ausente nos melanócitos da pele normal (Boissy et al., 1987). Além disto, as proteínas da família tirosinase são expressas somente nos melanossomas e estes possuem características morfológicas únicas, bem diferentes dos lisossomas.

Normalmente, os melanócitos são encontrados na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos da pele e transferem seus grânulos de melanina para os queratinócitos vizinhos, exercendo, assim, sua principal função biológica. O movimento dos melanossomas dentro do melanócito é mediado em parte pela miosina Va e pelo rab27a (Wu et al., 2001). Pouco se sabe sobre a transferência dos melanossomas para os queratinócitos e vários modelos são propostos.

Diferente dos melanócitos epidermais, os localizados em sítios extracutâneos mantêm seus grânulos no citoplasma (Boissy, 1998), o mesmo ocorrendo em situações patológicas como as melanocitoses dermais. As galinhas da raça Sedosa Japonesa (SK) são mutantes que apresentam, diferentemente de outras linhagens, uma extensa pigmentação dérmica e visceral (Makita and Mochizuki, 1984; Makita and Tsuzuki, 1986; Faraco et al., 2001).

Em trabalho anterior (Ortolani-Machado et al., manuscrito em preparação, 2006) caracterizamos os melanócitos dermais da pele de embriões da SK, em diferentes estágios de desenvolvimento, quanto a sua morfologia e distribuição. Neste, descrevemos o processo de amadurecimento do grânulo de melanina nos melanócitos dermais do embrião da SK com 19 dias de incubação. Também analisamos o padrão de distribuição dos melanosomas. Nossos resultados mostram que as etapas da melanogênese nestas células são similares aos dos melanócitos epidermais e também sugerem que não ocorre a transferência de seus grânulos para células vizinhas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos embriões

Ovos embrionados da galinha (*Gallus gallus*) da raça Sedosa Japonesa de plumagem branca, fornecidos pelo aviário da Universidade Federal do Paraná, foram incubados a 38°C, com umidade e ventilação controladas, até atingirem o estágio de desenvolvimento desejado (estágio 45 = 19 dias de incubação) (Hamburger e Hamilton, 1951). Os embriões coletados permaneceram em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e foram examinados em microscópio estereoscópico para definição do seu estágio de desenvolvimento.

### 2.2 Microscopia de Luz

Áreas de pele compreendendo derme e epiderme foram dissecadas da região dorsal do tronco, distendidas em placa de Petri e submetidas à fixação com paraformaldeído 4% em PBS. Posteriormente, foram lavadas em PBS, desidratadas em série crescente de etanol e embebidas em Paraplast ou historesina JB4. Cortes de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para observação da morfologia geral dos tecidos e células, azul de toluidina 1% (pH 2,8) para a identificação dos mastócitos e tricrômico de Masson para fibras colágenas (Drury e Wallington, 1980). Após a respectiva coloração, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Permount. Os cortes foram analisados em microscópio Olympus BX50 e as imagens obtidas com a ajuda do Programa Image Pro Plus.

### 2.3 Histoquímica

Para a demonstração da atividade da enzima tirosinase (DOPA oxidase), utilizamos o L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) como substrato.

As porções de tecidos foram incubadas com L-DOPA 0,1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a 37°C, por 4 horas. Em seguida, foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão como descrito no item 2.5.

Como controle para a reação enzimática, os tecidos foram incubados em meio onde o substrato foi omitido.

#### 2.4 Imunocitoquímica

O soro da galinha Smyth line detecta a enzima TRP-1 (Austin e Boissy, 1995), que possui um papel no processo de formação da melanina. Este soro é utilizado para a evidênciação de melanoblastos antes do aparecimento de características morfológicas próprias da linhagem melanocítica (Reedy et al., 1998a).

Fragmentos de pele dorsal da região do tronco foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS e preparados para microtomia em criostato, sendo lavados em PBS e embebidos em soluções de sacarose 5%, por 2 horas e 15%, durante a noite. No dia seguinte, foram infiltrados em gelatina 7,5% / sacarose 15%, a 37°C, por 6 horas, acondicionados em moldes com solução fresca de gelatina/sacarose e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Cortes de 10µm, coletados em lâminas previamente recobertas com gelatina, foram incubados com soro Smyth-line (SI) (1:400), durante a noite, a 4°C. O anticorpo secundário foi o IgG de cabra anti-galinha conjugado à fluoresceína (Chemicon) (1:200). As lâminas foram cobertas com Gelmount (Biomedica) e analisadas no microscópio Zeiss Axiophot equipado com epifluorescência.

#### 2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Pequenas amostras da pele dorsal do embrião foram fixadas em glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M e NaCl 50 mM, pH 7,4, por 2 h, a temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, lavadas em água destilada, coradas em bloco com uma solução de acetato de uranila aquosa 2% e preparadas para inclusão em resina Spurr (Spurr, 1969). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, segundo Reynolds (1963) e observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL-JEM 1200 EXII. As electronmicrografias foram obtidas com o Programa GATAN-MULTISCAN 600W.



## 2.6 Citoquímica para fosfatase ácida

As amostras preparadas para a demonstração ultraestrutural da atividade enzimática da fosfatase ácida (AcPase) foram fixadas em glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.4, contendo sacarose 7%, embebidas em ágar e os cortes de 50  $\mu\text{m}$  de espessura lavados duas vezes no tampão de incubação (tampão acetato  $5 \times 10^{-3}$  M pH 5.0 + sacarose 5%). A AcPase foi demonstrada incubando-se os cortes com  $\beta$ -glicerofofato de sódio (Gomori, 1952) usando o cloreto de cério como acceptor. Depois, os cortes foram lavados no tampão de incubação, no tampão cacodilato/sacarose, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, desidratados e incluídos em resina Spurr. No material controle o substrato foi omitido.

### 3. RESULTADOS

Os embriões da ave SK branca de 19 dias, raça utilizada neste trabalho, possuem uma pele totalmente preta, com penas brancas (Fig. 1a). Através da análise microscópica, observou-se que a pele é formada por uma epiderme composta por várias camadas celulares e uma derme espessa que repousa sobre o tecido adiposo. Os melanócitos não são encontrados na epiderme, porém se dispõem em rede, em grande quantidade, logo abaixo da espessa camada de fibras colágenas sub-epidermal, estando raras vezes entre elas, além de estarem distribuídos por toda a derme e ao redor dos vasos sanguíneos (Fig. 1b).

#### 3.1 Características ultraestruturais dos melanócitos dermais

Ultraestruturalmente, os melanócitos dermais em maturação apresentam um núcleo grande e claro, de formato irregular, várias mitocôndrias dispersas pelo citoplasma (Fig. 2a), ribosomas livres, retículo endoplasmático rugoso (RER) e liso (REL) em grande quantidade. O Complexo de Golgi (CG) é desenvolvido, formado por várias cisternas paralelas, levemente curvadas; pequenas vesículas arredondadas convergem para a face convexa do CG (*cis*) e vesículas maiores se destacam da face côncava (*trans*) da organela (Fig. 2b). Todos os estágios de formação dos grânulos de melanina são encontrados ocorrendo simultaneamente na célula (Fig. 2c). Nos melanócitos totalmente maduros as organelas relacionadas à formação dos grânulos de melanina estão menos desenvolvidas ou em menor número. Seu citoplasma está praticamente repleto de grânulos de melanina bem eletrondensos.

Os prolongamentos dos melanócitos dermais da SK são formados, principalmente, por processos citoplasmáticos longos e dendríticos. Devido a suas ramificações e à fina espessura dos cortes apenas pequenas porções de prolongamentos são evidenciadas nas micrografias eletrônicas (Fig. 2d). Assim, seu aspecto ramificado é melhor visualizado pela microscopia de luz ou pelo método da distensão (Ortolani-Machado, manuscrito em preparação, 2006). Não evidenciamos, ultraestruturalmente, com o método utilizado, microtúbulos, microfilamentos ou

filamentos intermediários no corpo celular e prolongamentos dos melanócitos dermais da SK.

### 3.2 Etapas da melanogênese

O produto eletrondenso da reação com L-DOPA foi observado na região da rede *trans* do Golgi e em túbulos e pequenas vesículas relacionadas a ele, presentes ao lado do núcleo e no corpo celular (Fig. 3a). Algumas vezes a reação positiva foi encontrada em pequenas vesículas e túbulos bem próximos ao início do prolongamento (Fig. 3b) ou em pequenas estruturas tubulares no prolongamento (Fig. 3c-d). Vesículas esféricas maiores, negativas para DOPA, provavelmente provenientes do REL, contêm estruturas pouco organizadas ou esféricas (Fig. 4a) no seu interior. Ao redor destas vesículas de diversos tamanhos se observam vesículas menores que parecem se fundir com as maiores. Estas vesículas grandes são chamadas melanossomas no estágio I. Com o desenvolvimento, vão se alongando (Fig. 4b) e se tornam elípticas. Suas estruturas internas também começam a se diferenciar em filamentos alongados, embora algumas estruturas esféricas ainda estejam presentes. Com o tempo estas estruturas se tornam helicoidais, orientadas paralelamente umas às outras e ao longo eixo da organela (Fig. 5a), nos cortes longitudinais. Em cortes oblíquos aparecem como estruturas concêntricas irregulares. Nesta situação estão no estágio II. O início da deposição regular da melanina nos filamentos helicoidais, com o conseqüente aumento de sua espessura, caracteriza o estágio III da melanogênese. Vesículas recobertas, provavelmente provenientes do CG, aparecem muito próximas ou fundidas aos melanossomas deste estágio (Figs. 5b e c). Quando os melanossomas estão totalmente melanizados, isto é, com todas as estruturas internas obscurecidas, são considerados melanossomas no estágio IV (Figs. 5a e d). Uma característica que parece típica dos melanossomas dermais da SK é a presença de melanossomas do estágio III contendo várias estruturas esféricas de diferentes tamanhos (Figs. 6a e b), que parecem ser adicionadas ao conjunto principal, ou gradualmente se fundirem, aumentando, assim, a área melanizada.

Melanossomas em vários estágios de melanogênese ocorrem em melanócitos dermais mesmo em fase bastante avançada do desenvolvimento do embrião.

Intrigante é se observar, nos prolongamentos dos melanócitos, organelas como mitocôndrias, ribossomas livres e REL, além de grânulos imaturos em diferentes estágios (Figs. 3c, 4a, 5a). Encontramos marcação positiva pelo soro Smyth line nos grânulos imaturos situados tanto no corpo celular quanto nos prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 6c). Nos grânulos maduros não houve marcação positiva.

Os passos relacionados à formação dos grânulos de melanina e o aspecto resultante em melanócitos dermais de SK estão resumidos na representação esquemática da fig. 7.

### 3.3 Destino dos melanossomas

Nos melanócitos dermais da SK não se observa a transferência de melanossomas apesar de sua proximidade com outras células encontradas na derme, como mastócitos, adipócitos (Figs. 8a-b), células musculares lisas e células endoteliais. Na trama de melanócitos localizados abaixo da camada de fibras parece que os prolongamentos se contactam entre si, porém não constatamos nenhuma transferência de melanossomas entre eles. São observadas projeções de membrana bem delgadas, semelhantes a filopódios, contendo melanossomas maduros (Fig. 8c). Algumas vezes, ocorre a exocitose de grânulos para o meio extracelular (Fig. 8d). Estes grânulos dispersos na matriz extracelular e também restos celulares de melanócitos são fagocitados por macrófagos que se encontram próximos ao local. Nestas células encontramos vacúolos positivos para a enzima fosfatase ácida (AcPase) (Fig. 8e). Imagens de fagocitose não são freqüentes, no entanto.

**FIGURAS**

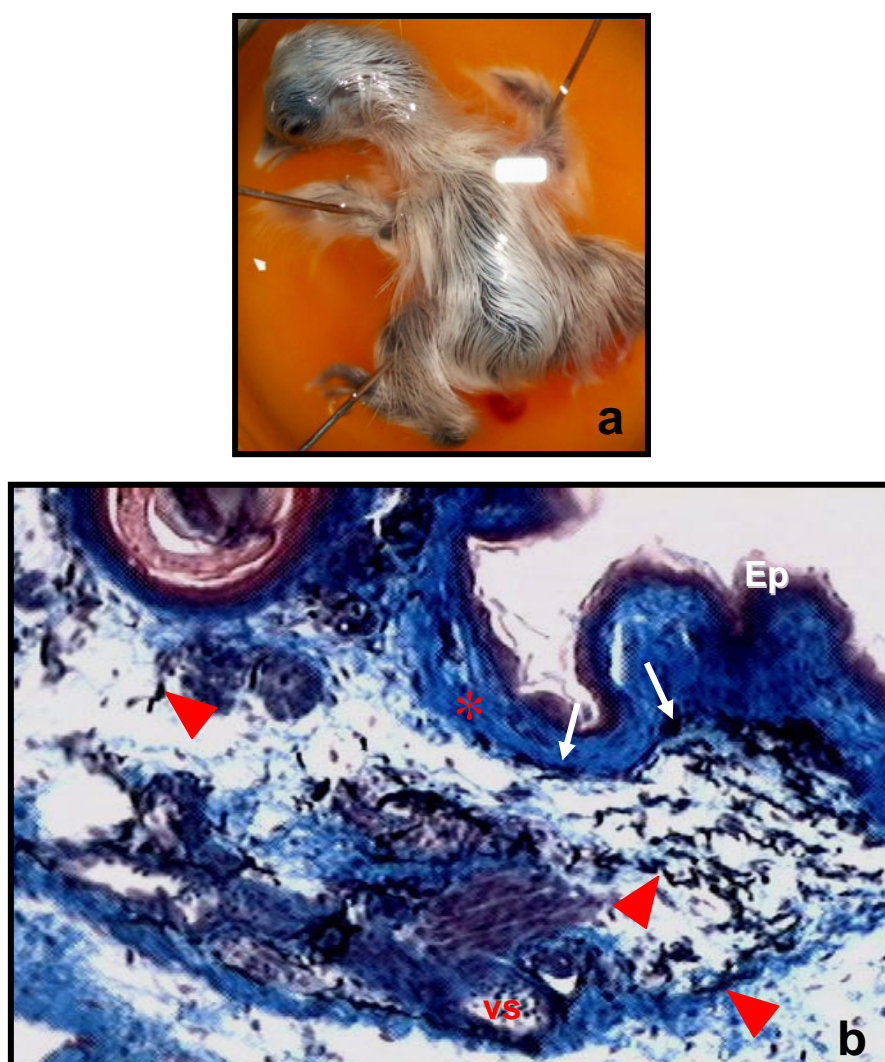


Fig. 1. a) Embrião de Sedosa Japonesa (SK) com 19 dias de incubação. b) Corte da região dorsal da pele do embrião. Ep: epiderme; \*: camada sub-epidermal de fibras colágenas; setas: melanócitos dispostos em rede; cabeças de seta: melanócitos distribuídos pela derme, vs: vaso sangüíneo. 1b: Tricrômico de Masson, 200x.

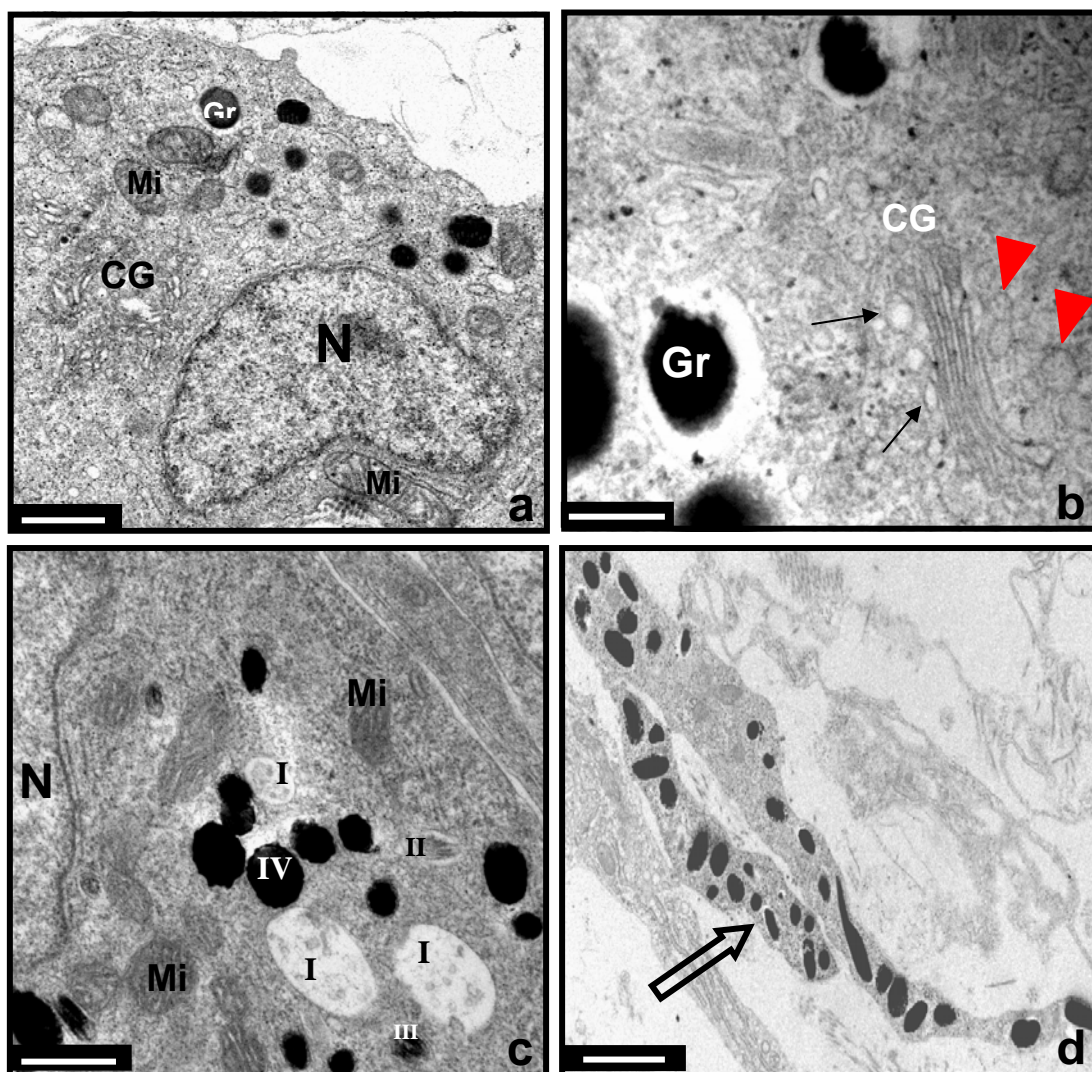


Fig. 2. Eletromicrografias de melanócitos dermais de embrião de Sedosa Japonesa. a) Melanócito em estágio inicial de maturação. b) Detalhe do Complexo de Golgi no melanócito em maturação. c) Todos os estágios de desenvolvimento do grânulo de melanina presentes no corpo celular. d) Corte do prolongamento de um melanócito dermal, contendo melanossomas. N: núcleo; Mi: mitocôndria; CG: Complexo de Golgi; Gr: grânulo de melanina; I, II, III, IV: melanossomas nos estágios I, II, III, IV, respectivamente; setas: vesículas na face *cis* do CG; cabeças de seta: vesículas na face *trans* do CG; seta vazada: pedaço do prolongamento do melanócito. Escala da barra: a = 1 $\mu$ m; b, d = 0,2 $\mu$ m; c = 0,5 $\mu$ m.



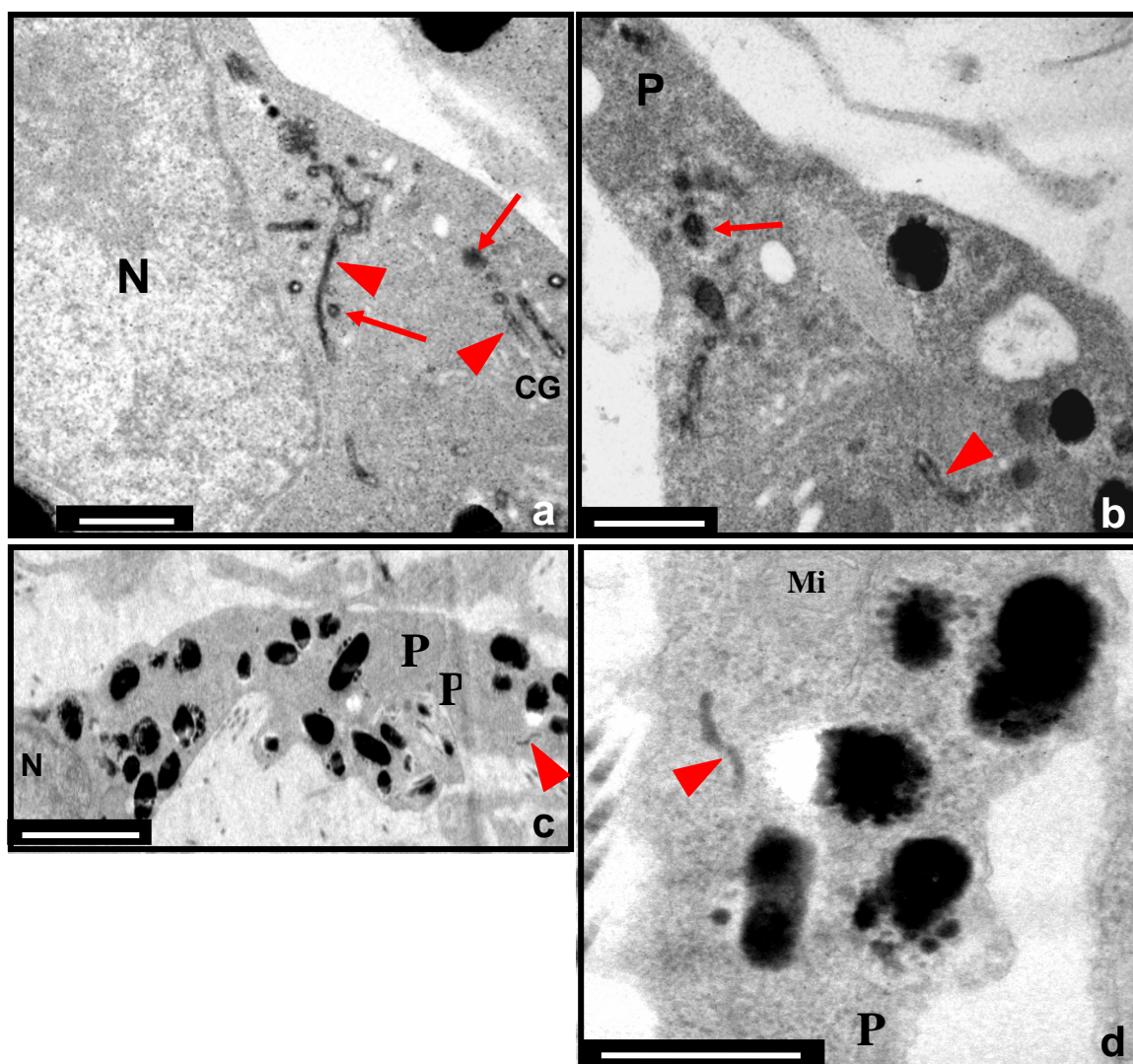


Fig. 3. Eletromicrografias de melanócitos em maturação, processados com L-DOPA. a) Marcação positiva no corpo celular, b) no início do prolongamento, e c) no prolongamento citoplasmático do melanócito. d) detalhe da marcação para DOPA. N: núcleo; Mi:mitocôndria; CG: complexo de Golgi; P: prolongamento citoplasmático; setas: vesículas marcadas com DOPA; cabeça de seta: estruturas tubulares marcadas com DOPA. Escala da barra: a, b, d = 0,5 $\mu$ m; c = 0,2 $\mu$ m.



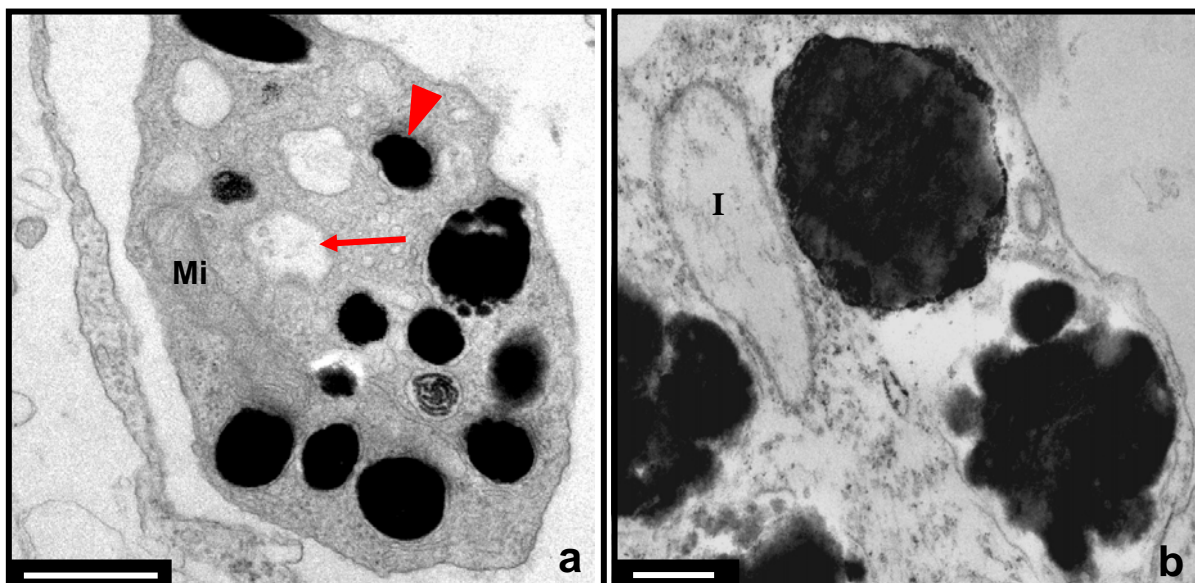


Fig. 4. Eletromicrografias de melanócitos em maturação. Observar melanossomas no estágio I. a) Grandes vesículas, contendo estruturas pouco organizadas ou esféricas. b) Melanossoma alongado, no estágio I, em fase mais adiantada. Mi: mitocôndria; seta: vesícula contendo estruturas esféricas; cabeça de seta: vesícula com estruturas pouco organizadas; I: melanossoma no estágio I, mais desenvolvido. Escala da barra: a = 0,5 $\mu$ m; b = 0,2 $\mu$ m.

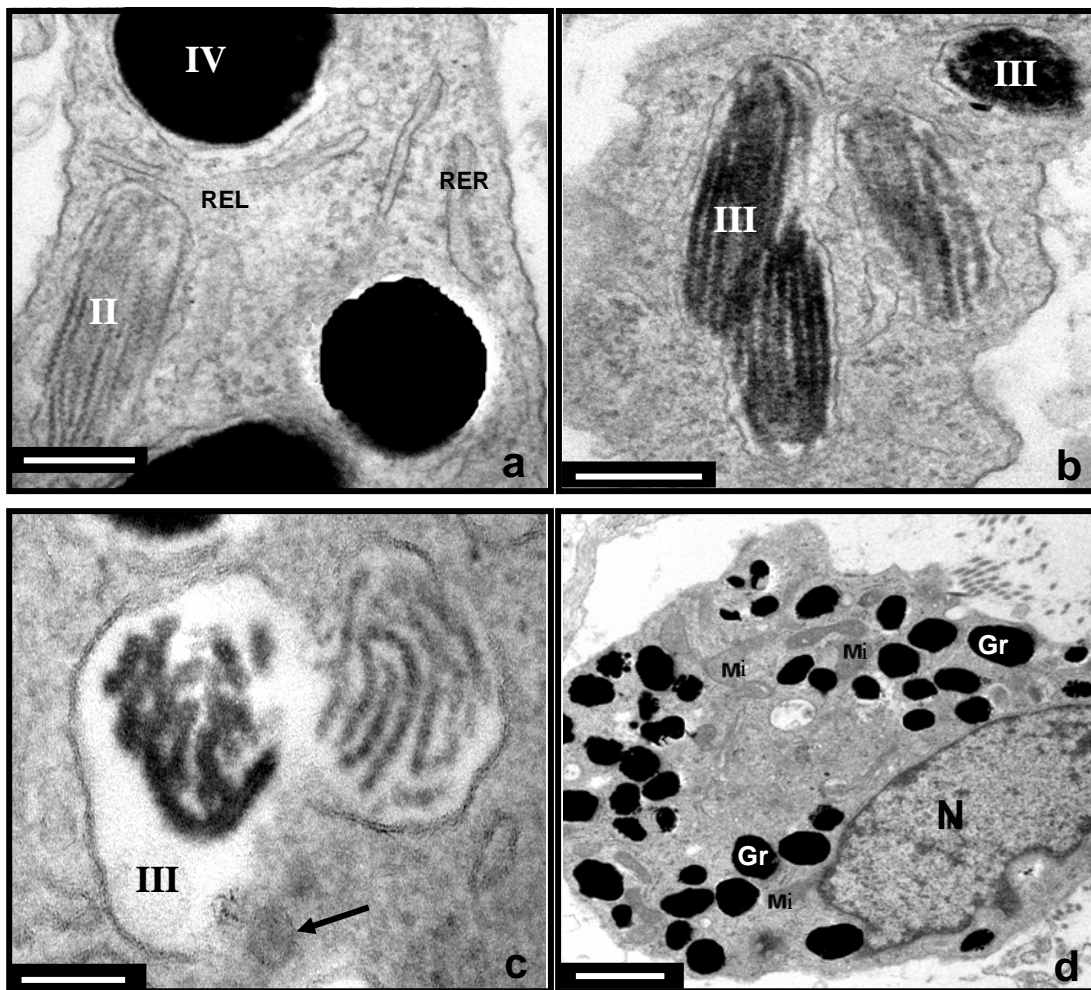


Fig. 5. Ultraestrutura dos melanossomas em vários estágios de maturação.

a) Melanossomas nos estágios II e IV. b) melanossomas alongados, no estágio III, com deposição de melanina nas estruturas paralelas; corte longitudinal. c) Corte oblíquo do melanossoma no estágio III. d) Melanócito repleto de melanossomas no estágio IV. N: núcleo; Mi: mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso; REL: retículo endoplasmático liso; II, III e IV: melanossomas nos estágios II, III e IV, respectivamente; flecha: vesícula recoberta. Escala da barra: a, c, d = 0,2 $\mu$ m; b = 0,1 $\mu$ m.

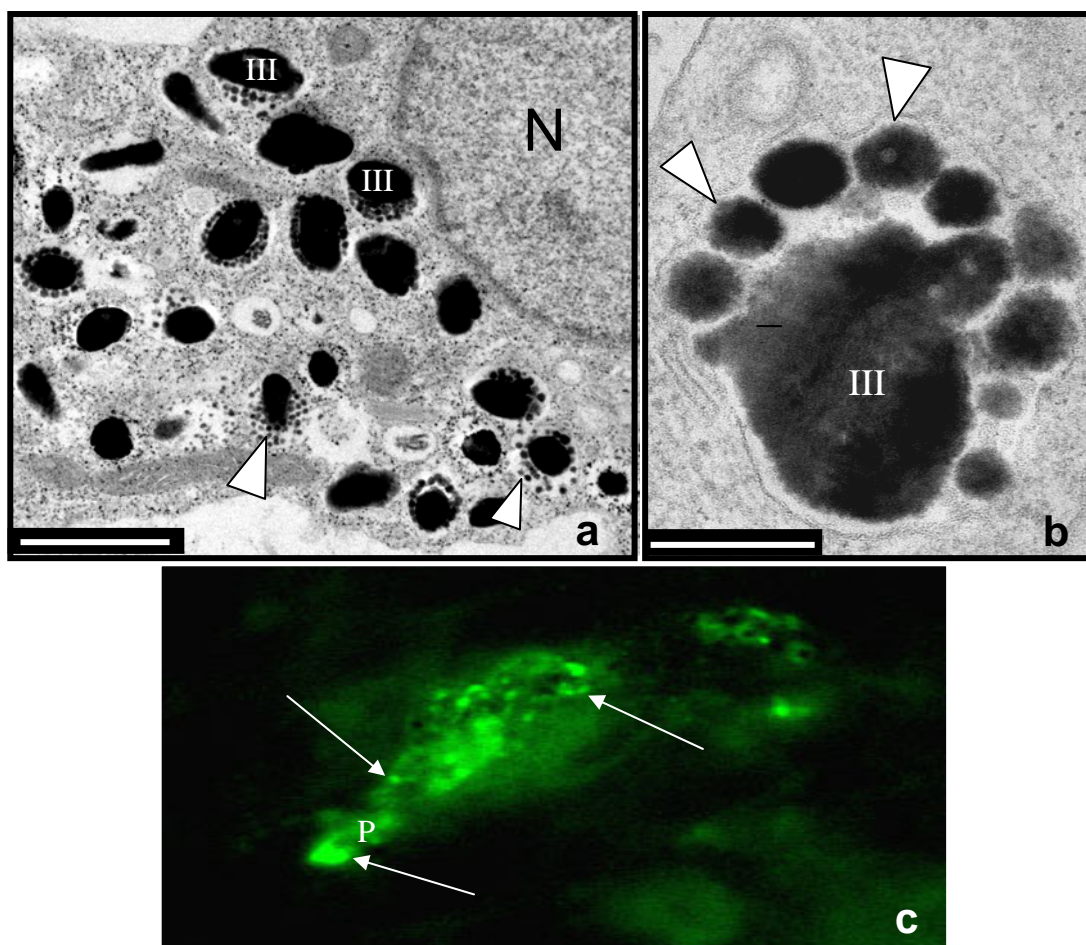


Fig. 6. a-b) Ultraestrutura dos melanossomas no estágio III. a) Corpo celular Do melanócito repleto de melanossomas. b) Detalhe do melanossoma. c) Melanócito em maturação imunomarcado pelo soro Smyth line (SI). Observe reação positiva nos grânulos imaturos, distribuídos por toda a célula. Flechas : grânulos S I- positivos ; N : núcleo; cabeças de seta : estruturas Esféricas melanizadas. P: prolongamento. Escala da barra : a = 1  $\mu$ m; b = 0,2 $\mu$ m. c: 630x.

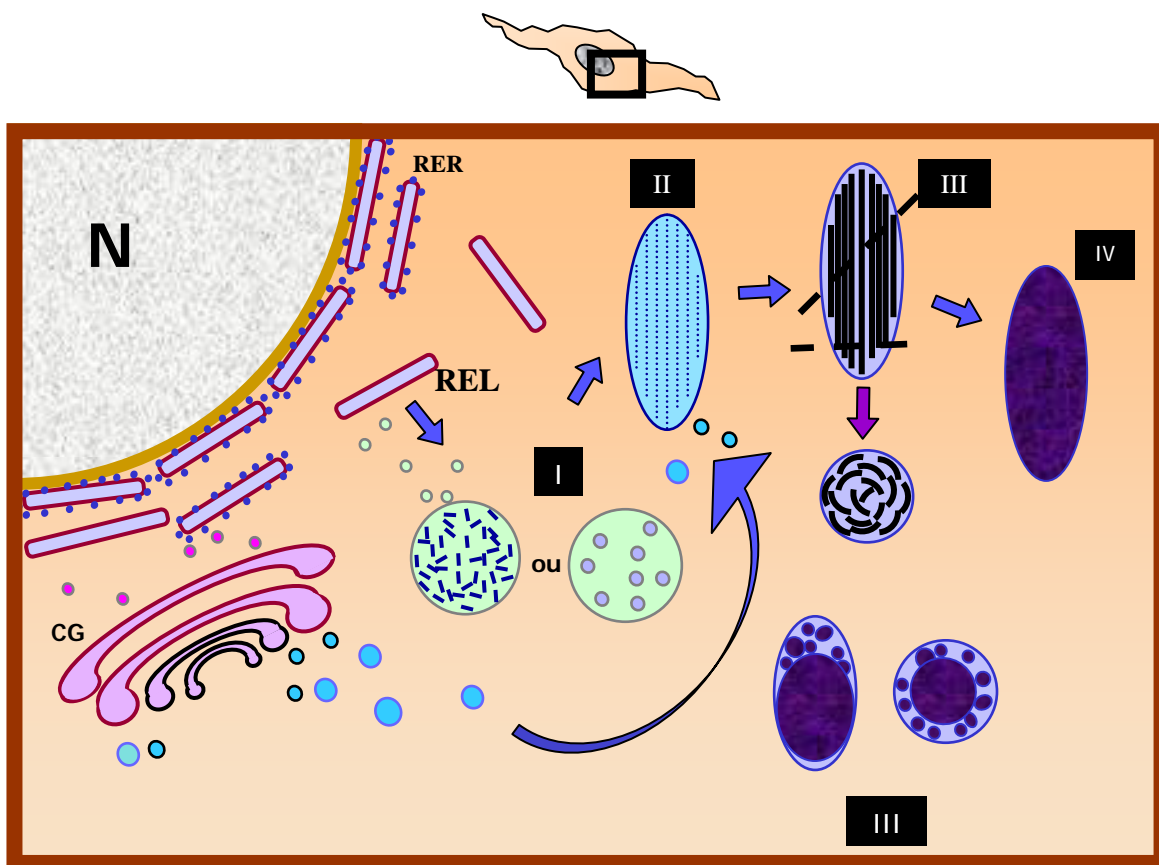


Fig. 7. Modelo representativo das etapas da formação dos grânulos de melanina.

RER: retículo endoplasmático rugoso; REL: retículo endoplasmático liso; CG: complexo de Golgi; N: núcleo; I, II, III, IV: estágios I, II, III, IV, respectivamente.



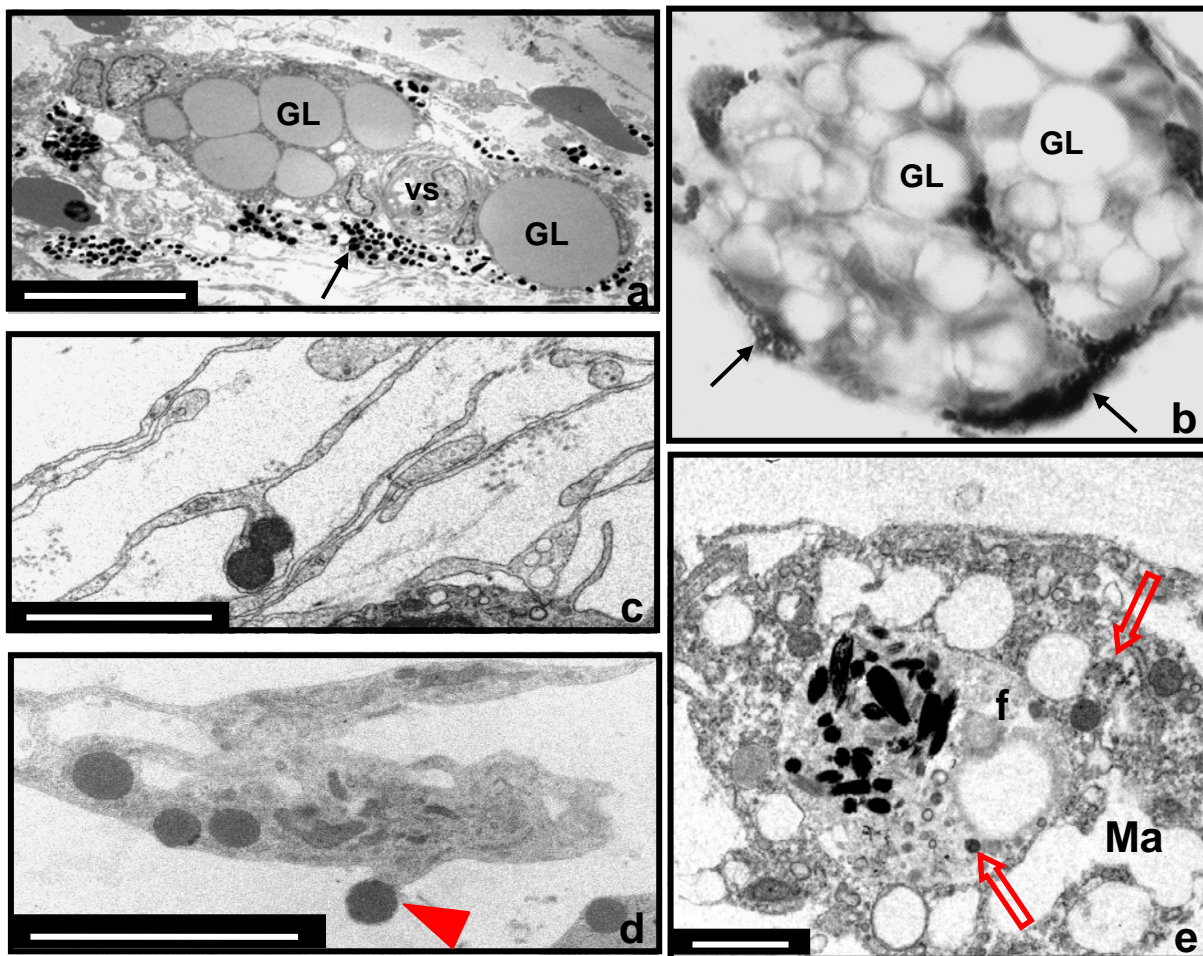


Fig. 8. Derme de embrião de Sedosa Japonesa. a-b) Relação dos melanócitos com o tecido adiposo. c) Eletromicrografia de uma projeção fina de melanócito, contendo dois grânulos de melanina maduros. d) Eletromicrografia de melanócito mostrando exocitose de melanossoma. e) Eletromicrografia de macrófago contendo vacúolo com porção de citoplasma de melanócito. a : aspecto ultraestrutural. b: microscopia de luz, HE, 1000X; Ma: macrófago; GL: gotícula lipídica; vs: vaso sangüíneo; f: fagosoma; setas: melanócitos; setas vazadas: produto de reação da fosfatase ácida; cabeça de seta: exocitose do grânulo de melanina. Escala da barra: a = 10  $\mu\text{m}$ ; c = 0,2  $\mu\text{m}$ ; d = 1  $\mu\text{m}$ ; e = 0,1  $\mu\text{m}$ .

#### 4. DISCUSSÃO

A galinha Sedosa Japonesa é uma mutante natural, com características genéticas distintas de outras raças de galinha, como polidactilia, penas nos pés, lobos do ouvido azuis, penas macias, além de possuir uma extensa pigmentação dérmica e visceral (Tsudzuki, 2003). Esta pigmentação ectópica ocorre porque os melanoblastos originados da crista neural que se destacam da porção dorsal do tubo neural, percorrem as duas vias de migração, dorsolateral e ventral (Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001), o que não acontece em outras raças, em que os melanoblastos só seguem a via dorsolateral. Nos embriões de 19 dias, os melanoblastos ainda estão presentes na derme mas não mais na epiderme e na SK de plumagem branca a diferenciação dos melanócitos acontece somente na derme e na epiderme das penas até o nascimento (Ortolani-Machado, manuscrito em preparação, 2006), enquanto em outras raças eles se diferenciam principalmente na epiderme (Le Douarin, 1982). Os melanócitos maduros encontrados na derme geralmente são considerados ectópicos e transitórios (Le Douarin, 1982; Sears e Ciment, 1988), porém, podem ocorrer normalmente nos vertebrados inferiores (sapos e peixes), em certas regiões da pele de camundongos selvagens adultos, em primatas (revisado por Quevedo e Holstein, 1998) e em lesões pigmentares humanas (Bevona et al., 2003; Murakami et al., 2005).

Nas aves, os trabalhos referentes à formação dos grânulos de melanina, a nível ultraestrutural, descrevem, em geral, o que ocorre em melanócitos presentes nas penas. Como os aspectos morfológicos da formação da melanina variam dependendo da espécie e do local onde os melanócitos se encontram, a pergunta que fizemos e buscamos responder é a seguinte: como seriam estes eventos nos melanócitos dermais do embrião da SK? Este trabalho, então, teve como objetivo caracterizar, ultraestruturalmente, o desenvolvimento dos grânulos de melanina e seu padrão de distribuição nos melanócitos dermais de embriões em fase tardia de desenvolvimento da galinha SK, na busca de uma melhor compreensão do processo da melanogênese nestas células naturalmente estáveis na derme.

## 4.1 Melanogênese

A biogênese dos melanossomas começou a ser entendida com o uso da microscopia eletrônica e com o avanço nos métodos de fracionamento sub-celular. Seiji e colaboradores (1963b) foram os que primeiro identificaram a organela que serviria como sítio da deposição de melanina, o melanossoma. Vários aspectos têm sido descritos a partir destes estudos iniciais e a terminologia encontrada na literatura para descrever a formação dos grânulos varia (Seiji et al., 1963a; Novikoff et al., 1968; Kushimoto et al., 2001). Neste trabalho empregamos a que enfoca quatro estágios de maturação (estágios I ao IV), com diferenças morfológicas distintas (Kushimoto et al., 2001).

O estudo da melanogênese foi facilitado com o advento da técnica histoquímica que revela a atividade DOPA oxidase da enzima tirosinase (Novikoff et al., 1968), o que resulta em uma deposição eletrondensa da melanina. Esta deposição ocorre naturalmente nos melanossomas nos estágios III e IV, porém, incubando-se os tecidos e células com L-DOPA, foi observado que esta deposição não ocorria somente nos melanossomas mas também na região da rede *trans* do Complexo de Golgi (TGN) (Novikoff et al., 1968) e em pequenas vesículas perto do TGN (Maul, 1969; Maul e Brumbaugh, 1971). Yamamoto e Takeuchi (1981) confirmaram a presença da enzima nestes locais e vários outros trabalhos descreveram a seqüência de eventos (Hirobe e Takeuchi, 1978; Quevedo e Fleischmann, 1980; Hirobe, 1982). Neste estudo, observamos nos melanócitos dermais do embrião da SK a marcação positiva para DOPA na face *trans* do Complexo de Golgi e em vesículas e túbulos. Intrigante é a presença de túbulos marcados por L-DOPA em porções de prolongamentos celulares de melanócitos.

A teoria da melanogênese, proposta por Jimbow e colaboradores (1976), diz que as vesículas carregadas de tirosinase (TYR) e outras enzimas da família TRP (proteínas relacionadas à tirosinase), como a Tyrp1 ou TRP1 (Jackson, 1988) e a Dct (dopacromo tautomerase) ou TRP2 (Jackson, 1992), se destacam do TGN, se fusionam com os pré-melanossomas (hoje chamados melanossomas no estágio II) derivados do retículo endoplasmático liso (REL), iniciando, então, o verdadeiro processo de melanização. O papel destas vesículas na melanogênese foi descrito, mostrando que elas são carreadoras específicas da tirosinase para o melanossoma

(Chakraborty et al., 1989) e que contêm outras enzimas que estão envolvidas na melanização, como moléculas precursoras da melanina monomérica (DHICA). Isto significa que estas vesículas contêm certos intermediários da melanização, além de algumas enzimas necessárias para sintetizar a melanina. Trabalhos recentes mostraram que as proteínas de membrana melanossomal são processadas no retículo endoplasmático onde vão passar por uma série de modificações pós-traducionais para, então, serem acumuladas no TGN e transportadas para o compartimento melanossomal (Jimbow et al., 2000; Setaluri, 2000; Raposo et al., 2001).

Os eventos da formação dos grânulos de melanina que ocorrem no corpo celular dos melanócitos dermais da ave SK parecem ser similares aos de melanócitos epidermais, com a presença de quatro estágios de amadurecimento. Jimbow e Fitzpatrick (1973) observaram que nos melanossomas do tipo I ocorre a presença de corpos vesiculares espalhados entre o material proteináceo amorfo e a membrana do melanossoma e que continuam a existir durante todo o desenvolvimento do grânulo dando ao melanossoma maduro o aspecto de “queijo suíço”. As vesículas do tipo I encontradas nos melanócitos dermais da SK são esféricas, contendo material amorfo ou pequenas estruturas arredondadas. Estas estruturas arredondadas são observadas somente nos estágios I e II, não fazem contato direto com a matriz das lamelas e nem possuem granulações finas no seu interior como observado nos corpos vesiculares, não se assemelhando, portanto, a eles.

Os melanossomas dos melanócitos dermais da ave SK no estágio II são similares na natureza fibrilar helicoidal paralela de seus filamentos a melanossomas deste mesmo estágio presentes no folículo piloso (Birbeck, 1963) ou na retina e coróide de alguns tipos de camundongos (Hearing et al., 1973). Nestes filamentos é que a melanina vai ser depositada (estágio III), aumentando seu diâmetro e tornando-os tão espessos que parecem se fundir (estágio IV). Os estágios III e IV são distintos somente pela quantidade de melanina depositada na matriz fibrilar (Kushimoto et al., 2001). A completa melanização geralmente resulta no mascaramento de todos os detalhes estruturais presentes nos grânulos, como observado nos melanócitos dermais da ave SK. Não é de nosso conhecimento a existência, em outros melanócitos, das várias estruturas esféricas encontradas nos



melanossomas de estágio III dos melanócitos dermais da SK, que vão se fundindo e aumentando a área melanizada do melanossoma. Imagem semelhante é vista na pena de outra ave adulta (Maul e Brumbaugh, 1971), porém nestes melanossomas a melanina é depositada sobre vesículas esféricas e não sobre estruturas alongadas. Na SK, as estruturas arredondadas observadas podem ser o resultado da deposição gradual da melanina ao redor dos filamentos longitudinais, vistos em corte transversal.

A presença de grânulos imaturos nos prolongamentos de melanócitos não é um fato que ocorra com frequência. São encontrados em situações anormais, como nos melanócitos de cultura primária de camundongos *dilute* (Provance Jr et al., 1996). Nestes camundongos, os melanócitos apresentam um acúmulo de melanossomas na região perinuclear, com ocasionais grupos de melanossomas imaturos nos prolongamentos. Nos melanócitos dermais em maturação da SK é comum a presença, nos prolongamentos, de melanossomas imaturos e algumas organelas relacionadas à formação dos melanossomas mas não se observa retenção de melanossomas no corpo celular. Grânulos marcados pelo soro Smyth line foram evidenciados em prolongamentos, e, ultraestruturalmente, identificou-se túbulos com reação positiva para L-DOPA. O significado da presença de estruturas relacionadas com o processo de melanogênese em prolongamentos de melanócitos dermais de SK ainda necessita investigação que possa esclarecer a dinâmica do tráfego destas organelas e a possibilidade de movimentação bidirecional.

#### 4.2 Destino dos melanossomas

Nos melanócitos epidermais, a biogênese do melanossoma e o processo de amadurecimento dos grânulos de melanina ocorrem no corpo celular. Quando estes grânulos estão maduros são transferidos para os queratinócitos através de prolongamentos dendríticos que partem do corpo celular dos melanócitos para sua distribuição nas camadas superiores da epiderme (Boissy, 2003). A transferência da melanina para os queratinócitos é essencial para proteger as células dos raios ultravioleta e também para dar cor à pele. Contudo, apesar da vasta literatura, ainda não estão esclarecidos os mecanismos de movimentação dos melanossomas dentro dos

melanócitos e de seus processos dendríticos e sua transferência para os queratinócitos.

O mecanismo que move os grânulos de melanina dentro dos melanócitos é bem estudado nos melanóforos de peixes e sapos, sendo que das várias possibilidades propostas, a mais aceita é a que envolve microtúbulos (Malawista, 1971). Nos mamíferos, acreditava-se que o movimento dos melanossomas dentro dos dendritos ocorria de uma forma unidirecional do centro da célula para as extremidades. Wu e colaboradores (1998), através de vídeo-microscopia, demonstraram que o movimento bidirecional também pode ocorrer. As proteínas motoras parecem ser as responsáveis pela movimentação bidirecional. A cinesina é uma proteína motora de microtúbulos que impulsiona os melanossomas em direção a extremidade (+) dos filamentos, que corresponde ao transporte anterógrado (Hara et al., 2000). A dineína irá mover os melanossomas na direção oposta, retrógrada (Byers et al., 2000). Quando os melanossomas alcançam a porção terminal do microtúbulo na periferia do dendrito devem ser capturados e retidos para prevenir seu movimento retrógrado. Esta captura é facilitada pela miosina Va, que se localiza com a actina e melanossomas na terminação distal dos dendritos (Wu et al., 1997). Mutações no gene da miosina Va ocasiona uma concentração de melanossomas no corpo celular dos melanócitos (Wu et al., 1998). A Rab27a, um membro da família de Rab GTPases envolvida no movimento e fusão vesicular, parece recrutar a miosina da superfície do melanossoma (Wu et al., 2001). A melanofilina (Mlph), um membro da família efetora RAB, regula o movimento do melanossoma nos dendritos (Matesic et al., 2001) e é necessária para a associação da miosina Va com o melanossoma (Provance et al., 2002). A partir destes trabalhos foi proposto que um complexo molecular composto pela Miosina V, Rab27a e Mlph, e provavelmente outras proteínas, facilitaria o transporte de melanossomas pelos dendritos e sua captura nas extremidades para posterior transferência para os queratinócitos. Estudos precisam ser realizados nos melanócitos dermais da ave SK para constatarmos ou não a existência deste complexo nestas células. Jimbow e Fitzpatrick (1976) mostraram que os melanócitos de mamíferos possuem filamentos de 10nm que estão envolvidos no alongamento e citomorfogênese dos dendritos e também na movimentação dos melanossomas. Utilizando-se a microscopia

eletrônica convencional não se observou a presença de microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários.

Vários trabalhos de microscopia de luz e eletrônica documentaram a organização das membranas e dos melanossomas durante sua transferência para os queratinócitos. O uso da vídeo-microscopia em cultivo de células também tem permitido a visualização direta da movimentação dos melanossomas (Scott et al., 2002). Três modelos tentam explicar esta transferência. Um descreve a liberação de melanina no espaço intercelular por exocitose e a subsequente fagocitose da melanina externalizada pelos queratinócitos vizinhos (Virador et al., 2002). Outro define que as membranas plasmáticas do dendrito do melanócito e do queratinócito se fundem e os melanossomas são transportados através de um túnel formado (Scott et al., 2002). E o terceiro sugere a citofagocitose, em que a extremidade do dendrito do melanócito é destacada e fagocitada pelo queratinócito (Yamamoto e Bhawan, 1994).

Nos melanócitos dermais os melanossomas não parecem ser transferidos a outras células. Nas melanocitoses dermais humanas, como Nevus de Ota (Hori et al., 1982) e manchas mongolianas (Okawa et al., 1979), os melanócitos estão presentes na derme mas não transferem e nem descarregam seus grânulos de melanina. O mesmo acontece nos melanócitos extracutâneos presentes no olho, ouvido interno e leptomeninges, porém no epitélio pigmentar da retina do olho há uma contínua translocação dos melanossomas da região perinuclear para a extremidade dos dendritos e vice-versa durante a adaptação do olho para o claro e escuro (Boissy, 1998). Na derme do embrião da SK, observamos, algumas vezes, a exocitose de grânulos de melanina. Grânulos de melanina liberados para o meio extracelular ou pedaços de citoplasma dos melanócitos parecem ser fagocitados pelos macrófagos dermais, mas não encontramos evidências de que este seja um processo contínuo, pois foi observado com pouca frequência. Apesar da proximidade de outras células (mastócitos, células musculares lisas, células endoteliais ou adipócitos) com os melanócitos, e da ocorrência de melanossomas em porções bem terminais destes, como os filopódios, a transferência de grânulos de melanina entre eles nunca foi observada. Análise mais detalhada é necessária para entender as relações entre células pigmentares e outros tipos celulares nestas localizações.

Devido à hiperpigmentação encontrada na derme dorsal da pele de embriões de SK, o que fornece uma ampla população de linhagem melanocítica, com possibilidades de isolamento das células para estudos mais detalhados, e pelo fato dos melanócitos dermais apresentarem continuado processo de melanogênese, o embrião da SK pode ser considerado um excelente modelo para o estudo dos detalhes envolvidos na gênese da pigmentação e das possíveis funções da melanina.

### **AGRADECIMENTOS**

Nós agradecemos ao Dr. R. Boissy pela doação do soro Smyth-line; ao Laboratório de Patologia Experimental, PUCPR, pelo uso do programa de captação Image Pro Plus; e ao Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR, pelo uso dos equipamentos de microscopia eletrônica.

## REFERÊNCIAS

- Austin LM, Boissy RE. (1995) Mammalian tyrosinase related protein-1 is recognized by autoantibodies from vitiliginous Smyth chickens. *Am J Pathol* 146:1529–1541.
- Bevona C, Tannous Z, Tsao H (2003) Dermal melanocytic proliferation with features of a plaque-type blue nevus and neurocristic hamartoma. *J Am Acad Dermatol* 49: 924-929.
- Birbeck MSC (1963) Electron microscopy of melanocytes: the fine structure of hair-bulb premelanosomes. *Ann N Y Acad Sci* 100:540-547.
- Boissy RE (1998) Extracutaneous Melanocytes. In: *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology*. JJ Nordlund, RE Boissy, VJ Hearing, RA King, and JP Ortonne (eds). New York: Oxford University Press. p 59-74
- Boissy RE (2003) Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol* 12:5-12.
- Boissy RE, Moellmann GE, Halaban R (1987) Tyrosinase and acid phosphatase activities in melanocytes from avian albinos. *J Invest Dermatol* 88:292-300.
- Byers HR, Yarr M, Eller MS, Jalbert NL, Gilchrest BA (2000) Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes. *J. Invest Dermatol* 114:990-997.
- Chakraborty AK, Mishima Y, Inazu M, Hatta S, Ichibashi M (1989) Melanogenic regulatory factors in coated vesicles from melanoma cells. *J Invest Dermatol* 93:616-620.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS (2000) Lysosome-related organelles. *FASEB J* 14:1265-1278.
- Drury RAB, Wallington EA. 1980. *Carleton's Histological Technique*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press.
- Faraco CD, Vaz SA, Pastor MV, Erickson CA (2001) Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. *Dev Dyn* 220:212-225.
- Gomori G (1952) *Microscopic Histochemistry: Principles and practice*. University of Chicago Press, Chicago, p. 189-194.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stage in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

- Hara M, Yarr M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrest BA (2000) Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol* 114:438-443.
- Hearing VJ, Phillips P, Lutzner MA (1973) The fine structure of melanogenesis in coat color mutants of the mouse. *J Ultrastructure Res* 43:88-106.
- Hirobe T (1982) Origin of melanosome structures and cytochemical localizations of tyrosinase activity in differentiating epidermal melanocytes of newborn mouse skin. *J Exp Zool* 224:355-363.
- Hirobe T, Takeuchi T (1978) Changes of organelles associated with the differentiation of epidermal melanocytes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 43:107-121.
- Hori Y, Ohara, Y, Niimura M, Kukita A (1982) Electron microscopy. Ultrastructural observations of the extracellular sheath of dermal melanocytes in the nevus of Ota. *American J Dermatopathology* 4: 245-251.
- Jackson IJ (1988) A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the *brown* locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4392-4396.
- Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hearing VJ (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J* 11:527-535.
- Jimbow K, Fitzpatrick TB (1973) Characterization of a new melanosomal structural component – the vesiculo globular body – by conventional transmission, high-voltage, and scanning electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.*, 48: 269-283.
- Jimbow K, Fitzpatrick TB (1976) Changes in distribution pattern of cytoplasmic filaments in human melanocytes during ultraviolet-mediated melanin pigmentation. *J Cell Biol* 65:481-488.
- Jimbow K, Davison PF, Pathak MA, Fitzpatrick TB (1976) Cytoplasmic filaments in melanocytes: their nature and role in melanin pigmentation. *Pigment Cell Res* 3:13-32.
- Jimbow K, Park JS, Kato F, Hirosaki K, Toyofuku K, Hua C, Yamashita T (2000) Assembly, Target-Signaling and Intracellular Transport of Tyrosinase Gene Family Proteins in the Initial Stage of Melanosome Biogenesis. *Pigment Cell Res* 13:222–229.

- Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD, Ferrans VJ, Muller J, Appella E, Hearing VJ (2001) A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci* 98(19):10698-10703.
- Le Douarin NM (1982) *The Neural Crest*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 445 p.
- Makita T, Mochizuki S (1984) Distribution of pigment cells in tissues of Silky fowl. I. Light microscopic observations. *The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine* 11: 17–38.
- Makita T, Tsuzuki Y (1986) Distribution of pigment cells in tissues of silky fowl. II. Embryological survey. *The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine* 13: 11–20.
- Malawista, SE (1971) The melanocyte model: colchicine-like effects of other antimitotic agents. *J Cell Biol* 49:848-855.
- Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O'Sullivan TN, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA (2001) Mutations in *Miph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10238-10243.
- Maul GG (1969) Golgi-melanosome relationship in human melanoma in vitro. *J Ultrastruct Res* 26:163-176.
- Maul GG, Brumbaugh JA (1971) On the possible function of coated vesicles in melanogenesis of the regenerating fowl feather. *J Cell Biol* 48:41-48.
- Murakami F, Soma Y, Mizoguchi M (2005) Acquire symmetrical dermal melanocytosis (naevus of Hori) developing after aggravated atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 152:903-908.
- Novikoff AB, Albala A, Biempica L (1968) Ultrastructural and cytochemical observations on B16 and Harding-Passey melanomas. The origin of premelanosomes and compound melanosomes. *J Histochem Cytochem* 16:299-319.
- Okawa Y, Yokota R, Yamauchi A (1979) On the extracellular sheath of dermal melanocytes in nevus fuscoceruleus acromiodeltoideus (Ito) and Mongolian spot. An ultrastructural study. *J Investigative dermatology* 73: 224-230.
- Orlow SJ. (1995) Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 105:3-7.

- Ortolani-Machado CF, Freitas PF, Borges ME, Faraco CD (2006) Special features of dermal melanocytes in white Silky chicken embryos. Manuscrito em preparação.
- Provance DW Jr, James TL, Mercer JA (2002) Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* 3:124-132.
- Provance DW Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA (1996) Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14554-14558.
- Quevedo Jr WC, Fleischmann RD (1980) Developmental biology of mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 75:116-120.
- Quevedo Jr WC, Holstein TJ (1998) General biology of Mammalian Pigmentation. In: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. JJ Nordlund, RE Boissy, VJ Hearing, RA King, and JP Ortonne (eds). New York: Oxford University Press, p. 43-58.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 152:809–824.
- Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. (1998a) The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Dev Biol* 200:234-246.
- Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA (1998b) Specification and migration of melanoblast at the vagal level and in hyperpigmented silkie chickens. *Dev Dyn* 213:76-485.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC (2002) Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci* 115:1441-1451.
- Sears R, Ciment G (1988) Changes in the migratory properties of neural crest and early crest-derived cells in vivo following treatment with a phorbol ester drug. *Dev Biol* 130: 133-143.
- Seiji M, Kikuchi A (1969) Acid phosphatase activity in melanosomes. *J Invest Dermatol* 52:212-216.



- Seiji M, Fitzpatrick TB, Simpson RT, Birbeck MSC (1963a) Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melamiin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* 197:1082-1084.
- Seiji M, Shimao K, Birbeck MSC, Fitzpatrick TB (1963b) Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 100:497-533.
- Setaluri V (2000) Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res* 13:128-134.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara, S, Wortsman J (2003) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84:1155-1228.
- Spurr, AR (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31-43.
- Tsudzuki, M (2003) Japanese Native Chickens. In: The relationship between indigenous animals and humans in APEC region. Chang HL and Huang YC eds. The Chinese Society of Animal Science, Tainan. p.91-116.
- Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, Kobayashi N, Wakamatsu K, Ito S, Hammer JA, Hearing VJ (2002) Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB J* 16:105-107.
- Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JAIII (1998) Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vivo. *J Cell Biol* 143:1899-1918.
- Wu X, Bowers B, Wei Q, Kocher B, Hammer JAIII (1997) Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J Cell Sci* 110:847-859.
- Wu X, Rao K, Bowers B, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer JAIII (2001) Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci* 114:1091-1100.
- Yamamoto H, Takeuchi T (1981) Immunoelectron microscopic localization of tyrosinase in the mouse melanocyte. *J Histochem Cytochem* 29(8):953-958.
- Yamamoto O, Bhawan J (1994) Three models of melanosome transfer in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res* 7:158-169.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os melanócitos dermais localizados na região dorsal de embriões da ave SK, entre 6 e 19 dias de incubação, para tentar elucidar que funções eles exerceriam neste local. Através dos experimentos realizados para responder nossos objetivos iniciais e da literatura estudada, chegamos a algumas conclusões.

A distribuição de melanoblastos nos embriões da SK, em vários estágios de desenvolvimento, indica que a presença destas células na epiderme ocorre até determinada fase, desaparecendo gradualmente até não serem mais encontradas aos 19 dias de incubação. Os melanoblastos dermais ainda são vistos neste estágio, sugerindo que a derme deva conter fatores, ainda não descritos, que direcionem os melanoblastos para estes sítios ectópicos e que permitam sua proliferação e diferenciação em melanócitos. Lecoin e colaboradores (1995) já demonstraram que o *c-kit* e o *Steel factor* não são responsáveis pela sobrevivência, proliferação e extensiva distribuição das células melanocíticas no mesoderma do embrião de SK. A investigação da presença de outros fatores além do *Steel factor*, com o uso de extratos de embriões de SK e da análise do comportamento de células de linhagem melanocítica de SK em cultivo será objeto de futuras investigações em nosso laboratório. Necessitamos também reproduzir os experimentos com o soro Smyth line na pele dorsal do recém-nascido, jovem e adulto da SK para verificarmos se melanoblastos ainda se encontram na derme desta galinha após o nascimento, garantindo a constante reposição de células da linhagem, uma vez que a população parece se manter durante toda a vida adulta. Se melanoblastos e células imaturas estiverem presentes na fase adulta, analisaremos se a linhagem melanocítica é mantida pela proliferação destes, como acontece nos embriões de SK. Além de fatores solúveis, componentes da matriz extracelular podem ter influência sobre a manutenção e mesmo atividade fisiológica dos melanócitos dermais de SK, e, portanto, devem também merecer análise mais detalhada futuramente.

A população de melanócitos nos embriões em estágios mais tardios de desenvolvimento ainda está passando pelo processo de melanogênese, pois encontramos na derme, aos 19 d de incubação, melanócitos em maturação.

Precisaremos, agora, analisar a derme da SK, do nascimento até a fase adulta, para constatarmos ou não a existência destes melanócitos imaturos após o nascimento.

A forma dos melanócitos varia, dependendo do local. Na derme profunda são arredondados e na derme superficial, alongados e repletos de prolongamentos citoplasmáticos. As células em divisão são esféricas, sugerindo que a derme profunda possa ser a responsável pela manutenção do potencial proliferativo desta linhagem de células. Investigação futura analisará se esta variação de forma ocorre na galinha adulta, paralelamente à análise de possíveis diferenças entre expressão de fatores de proliferação nas duas regiões de derme.

Como melanoblastos e melanócitos nunca foram encontrados dentro de vasos sangüíneos com as técnicas empregadas neste trabalho, precisaremos utilizar outras, como isolamento de células de sangue ou injeção de células marcadas com substâncias fluorescentes, para confirmar a presença ou não destas células no interior dos vasos. Os melanócitos se dispõem ao redor dos vasos sangüíneos, desde as fases iniciais de diferenciação, formando redes por toda a extensão do vaso. Que fator(es) estará(ão) presente(s) neste local que impede(m) a entrada dos melanócitos no vaso sangüíneo? Ou que possíveis componentes de membrana de melanócitos dermais de SK bloqueiam sua interação com o endotélio? A descoberta deste(s) fator(es) seria(m) de suma importância para o estudo do melanoma.

As fibras colágenas e elásticas formam uma espessa camada logo abaixo da epiderme e parecem servir de barreira, impedindo que melanoblastos e melanócitos invadam a epiderme nos estágios mais tardios de desenvolvimento. Melanócitos alongados e bastante ramificados se localizam logo abaixo desta camada e seus prolongamentos parecem se contactar entre si, formando uma rede. Através de imunomarcações, verificaremos a existência ou não de estruturas de superfície e/ou adesão celular nos locais de contato dos prolongamentos citoplasmáticos. Também realizaremos uma nova análise ultraestrutural dos melanócitos dermais, empregando técnicas específicas para uma melhor evidenciação das membranas celulares, com uso de lantânio ou vermelho de rutênio.

Os eventos da formação dos grânulos de melanina que ocorrem no corpo celular dos melanócitos dermais da SK são similares aos dos melanócitos epidermais encontrados em mamíferos. Porém, no estágio III ocorre a presença de estruturas esféricas que parecem típicas somente destes melanócitos. O isolamento

com subfracionamento celular pode fornecer material que permita a análise mais detalhada da organização destes melanossomas.

Melanossomas em vários estágios de melanogênese são encontrados em melanócitos dermais mesmo em fase bastante avançada do desenvolvimento do embrião, tanto no corpo celular quanto nos prolongamentos. Será que nos animais adultos eles ainda estarão presentes? Takeuchi (1968) encontrou reação positiva pelo DOPA nos melanócitos de camundongo somente durante as primeiras semanas após o nascimento. A incubação com L-Dopa de porções de pele de animais nascidos pode fornecer dados sobre a melanogênese em fases mais tardias. A presença de melanossomas imaturos nos prolongamentos também é um fato intrigante. Para analisá-lo precisaremos verificar, através da microscopia eletrônica de transmissão, se os filamentos intracelulares envolvidos na movimentação dos melanossomas na SK são os mesmos encontrados em outras aves (poucos microtúbulos e abundantes microfilamentos e filamentos intermediários, Jimbow e Fitzpatrick, 1975). A presença de grânulos imaturos ao lado de maduros, bem como de túbulos marcados por L-Dopa em prolongamentos celulares, sugere uma movimentação de organelas que pode ser muito rápida, e mesmo bidirecional. Faz-se necessário checar o possível envolvimento de miosina Va, um motor celular relacionado à actina envolvido no transporte de melanossomas (Wu et al., 1997), ou perturbações de sua função em SK. Para isso estabelecemos colaboração com o laboratório da Dra. Enilza Spreafico (USP-Ribeirão Preto) e experimentos-piloto já estão em andamento.

Os melanócitos dermais de embriões com 19d de incubação estão próximos a outros tipos celulares, como mastócitos, células adiposas, endoteliais e musculares lisas, mas não foi evidenciada a transferência de melanossomas dos melanócitos para estas células. O leque de possíveis funções para melanócitos, inclusive na imunidade (Mackintosh, 2001), amplia-se a cada dia, e a investigação das relações celulares na derme de SK pode contribuir para esclarecer interações ainda não levadas em conta.

Além dos citados acima, novos focos de investigação, relacionados com apoptose de melanócitos, análise das células cultivadas em diferentes substratos, exame detalhado da melanina, deverão ser realizados no futuro para respondermos estas e outras perguntas.

Podemos concluir que este trabalho constitui uma valiosa contribuição para a caracterização dos melanócitos dermais do embrião de SK. Além disso, o embrião da SK pode ser considerado um ótimo modelo para o estudo dos passos envolvidos na melanogênese e das possíveis funções da melanina já que sua hiperpigmentação dermal representa rica fonte de material para análise.

## REFERÊNCIAS

LECOIN, L.; LAHAV, R.; MARTIN, F.H.; TEILLET, M.A.; LE DOUARIN, N.M. *Steel* and *c-kit* in the development of avian melanocytes: A study of normally pigmented birds and of the hyperpigmented mutant Silky fowl. **Dev. Dyn.** 203, p.106–118, 1995.

MACKINTOSH, J.A. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. **J. Theor. Biol.** 211, p.101-113, 2001.

TAKEUCHI, T. Genetic analysis of a factor regulating melanogenesis in the mouse melanocyte. **Jap. J. Genet.** 43, p.249-256, 1968.

WU, X.; BOWERS, B.; WEI, Q.; KOCHER, B.; HAMMER, J.A.III. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. **J. Cell Sci.** 110, p.847-859, 1997.