



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Bianka Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE REPROGRAMAÇÃO CELULAR DE
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA EM *COTURNIX COTURNIX*
JAPONICA (CODORNA)**

**Florianópolis
2009**

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Colegiado do Curso de Graduação em Ciências Biológicas

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE REPROGRAMAÇÃO CELULAR DE
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA EM *COTURNIX COTURNIX*
JAPONICA (CODORNA)**

Trabalho de Conclusão do Curso
(Estágio II – BIO 5156)

ACADÊMICA: Bianka Silva de Oliveira
Ciências Biológicas, 9ª fase

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

CO-ORIENTADOR: Dr. Ricardo Castilho Garcez
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

Florianópolis, julho de 2009.

Assinatura do(a) Acadêmico(a)

Assinatura do(a) Orientador(a)

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE REPROGRAMAÇÃO CELULAR DE
CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA EM *COTURNIX COTURNIX*
JAPONICA (CODORNA)**

BIANKA SILVA DE OLIVEIRA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

Prof. ^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Prof. ^a Dr.^a Luciane Maria Perazzolo (Membro Titular)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Denise Avani Bittencourt, MSc. (Membro Titular)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Aloisio Luiz Benedetti, MSc. (Membro Suplente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Florianópolis, 02 de julho de 2009

“A ciência não é a atividade séria que muitos pensam. Impregnados de preconceitos de toda ordem, nós, os cientistas, atrasamos, inúmeras vezes, o progresso da própria ciência simplesmente porque, em geral, não dispomos do brilho intelectual, da imparcialidade, da visão crítica, da liberdade de pensamento, da capacidade de bem julgar etc., características que vivemos alardeando como nossas principais qualidades. Não somos melhores que os comerciantes, os operários, os sacerdotes, os poetas. Damos muita importância à posição exercida pelo cientista que faz declarações, à língua em que o trabalho é redigido, à nacionalidade de quem criou a hipótese, à revista em que o trabalho é publicado, ao fato de estar a nova verificação de acordo com verificações antigas etc. A ciência não vive de verdades, o cientista não é um construtor de verdades. No reino das grandes teorias e mesmo, às vezes, das pequenas hipóteses, a ciência se alimenta, muitas vezes, de crenças baseadas em dados insuficientes.”

Newton Freire-Maia

“Assim, se a gente lhes disser: "A prova de que o principezinho existia é que ele era encantador, que ele ria, e que ele queria um carneiro. Quando alguém quer um carneiro, é porque existe" elas darão de ombros e nos chamarão de criança!

Mas se dissermos: "O planeta de onde ele vinha é o asteróide B 612" ficarão inteiramente convencidas, e não amolarão com perguntas. Elas são assim mesmo. É preciso não lhes querer mal por isso. As crianças devem ser muito indulgentes com as pessoas grandes.

Mas nós, nós que compreendemos a vida, nós não ligamos aos números! Gostaria de ter começado esta história à moda dos contos de fada.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Então povo! Ai, acho que tem algo errado com esse parágrafo! Mas, como agradecimentos são *free style* (eu espero) vai assim mesmo, vocês sabem como sou avessa a formatações ou a qualquer tipo de organização e também cansei de ficar arrumando o TCC.

Bom, gostaria de agradecer à Prof.^a Andréa Gonçalves Trentin, por ter me aceitado no laboratório, por todas as correções durante esses 3,5 anos entre relatórios e TCC, por ter tido paciência e por não ter me expulsado durante todo esse tempo! Gostaria de agradecer aos membros da banca, Prof.^a Luciane Maria Perazzolo, a Denise Avani Bittencourt e Aloisio Luiz Benedetti, por terem aceitado o convite e pela paciência e compreensão no atraso da entrega do TCC! Muito obrigada!

“Oooooooooo Ricaaaardo”, muito obrigada por ter ouvido esse chamado milhares de vezes e por ter empregado uma paciência gigante para responder todas as minhas perguntas, tirar minhas dúvidas, por incentivar o pensamento, por permitir que eu fizesse isso do meu jeito, ou seja, por respeitar minha identidade. Por ter me ensinado um monte de coisa, especialmente a ter fé! Por sempre ter uma palavra de alento que dá um ânimo a mais pra continuar! No mais, não vou ficar aqui descrevendo tuas inúmeras qualidades! Qualquer um pode ver teu potencial no teu mapa astral HAHAHAAAA.

[Começo a sentir que os agradecimentos podem ficar maiores que a introdução]

Claro que minha permanência na bio até o final não teria acontecido se eu não tivesse a companhia diária de vocês, Bi-c, Clair, Lane, May, Su e Zucco. A Bi-c sempre brigando comigo, sendo muito estorva, fazendo chantagens emocionais sobre “porque com tuas outras amiguinhas tu sai”, *mas* (hahaha) que é uma ótima pessoa com a qual posso contar sempre, principalmente pra pedir opiniões imparciais! A Clair que eu sempre incomodava durante as aulas e que diferente da Su, não me batia por isso! A Lane, que com sua personalidade meio doida, meio japasériabrava tentava, que nem a bi, me endireitar!

A Su que se faz de brava, mas que é uma querida sempre disposta a ajudar todo mundo, se bem que já levei muito tapa no braço dela, e que mão

pesada, vou te contar, mas que apesar disso, me deu o melhor presente que um ser humano poderia querer, uma garrafa de *tequila reposada*! =D E que me ensinou muuuuita coisa no lab., especialmente a como bem fechar um pacote de caixa de ponteiras (hahahaha)! A May, com quem sempre pude fazer piadinhas quando o Avaí perdia :D A Zucco, sem comentários, ela que *desvirtuou* minha vida e com a qual dou muita risada com as observações sem nexos, que é extremamente importante para o desenvolvimento de conversas sem sentido no MSN falando de 3 coisas ao mesmo tempo e que ninguém mais entende! Com quem eu pude conversar aleatoriedades durante a aula, enquanto que a Bi e a Su ficavam bravas e faziam cara feia =X E que chegou ao cúmulo de me prometer um presente caso eu fosse a semana toda pra aula de parasito, sem me atrasar! Ainda vamos enfiar a cara na torta! *Atóron!*

Do povo do lab., gostaria de agradecer à Bruna, semeadora da discórdia, com quem junto com a Zucco, pude tramocar os planos mais perversos, geralmente em relação ao New, rapaxx bom, que sempre tirava as codornas pra mim mediante pagamento em raspadinha ou chocolate, seu viciado! À mana Talita, por todas as conversas sobre a vida acadêmica e por sempre fazer a gente rir muito com seus traumas de infância! À queridíiiiissima Maria Cecília, pelo mega apoio moral sempre dado e com quem sempre se pode contar pra ir comer porcarias, por ser um modelo de pessoa e profissional, fazendo com que eu ainda tenha fé no mundo! À Bia, por todas as histórias engraçadas (especialmente aquela em que fosses parar embaixo do ônibus na Itália) e por eu sempre poder incomodá-la!

Aos com que não conversava tanto, mas foram muito importantes! Fernanda, com sua expressão de brava e que faz altos bolo bom, Denise, especialmente nessa nova fase em que se encontra mais maternal (hahaha), Diego, que sempre tem uma piada que de tão ruim é engraçada (=D), Vivi, sempre empolgada pra fazer as coisas, Ezequiel, sempre disposto a ajudar e que, apesar de não ter o hábito de andar com remédio pra cólica, arranjou um pra mim quando precisei (=D), a Mari com seu café e seu cigarro no corredor e a todos os demais (não citarei porque posso esquecer alguém) que fazem parte do lab. e ajudam pra que tudo funcione bem! Aos que já saíram, Bruno, do qual eu tinha medo no começo mas (hahaha) que é uma ótima pessoa, a Cláudia, com quem podia contar pra responder minhas perguntas, a Meline, nunca vou esquecer o dia que ela me incentivou a treinar castanhola no lab. quando não tinha ninguém (hahaha), ao

Ricardinho, super querido e que volta e meia manda email do Japão, o que sempre me deixa feliz!

Aos de fora da bio, Aninha (e seus bafões, abraço e sorriso enormes quando nos encontramos pela UFSC) e Pedro (e seu jeito engraçado, com quem adoro conversar e chatear), maninha Carla (MUITO obrigada por todo o apoio sempre, especialmente nesse final!), Tami (enrolona, mas que sempre vai comigo comer cachorro-quente =D), Larita, muito³ obrigada pelo imenso apoio e compreensão, por todas as conversas, saídas e risadas, Pat e Kél, parceiríssimas pra todos os programas alternativos que ninguém em sã consciência aceitaria ir hahahahaha, à Carol, que sempre me deixa recados de bom dia no Orkut, sem a qual não teria ido ao show do Jorge Drexler =o, pelos “boa sorte” com o TCC que sempre me desejava! Ao meu *irmão gêmeo ruivo loiro cigano separado na hora do parto* Thomas, το καλύτερο παιδί του κόσμου (hahaha) cuja importância na minha vida e apoio moral nesses tempos vão além do que possa se descrever ou imaginar, muchísimas gracias vinchuca! À Narda, primeira professora de flamenco, super empolgada e que sempre me incentivou muito, muito obrigada por todas as oportunidades, por ser super parceira, por todos os momentos, entre cômicos e drásticos (uhahauhauha) nas apresentações e aulas, OLÉ! Ao prof. Rocha, professor de gaita de boca, pelo constante incentivo e apoio e por ser compreensivo com as últimas semanas que faltei, em função do TCC. Ao prof. de grego, Apóstolo, por ser um exemplo de professor e dedicação. Aos professores da bio, Marguerita, Luciane, Risoleta, Carla Tasca, Afonso, Paulo Hoffman, Dani, Margarida, Paulinho de zoo, que pela qualidade de ensino, fizeram a faculdade valer a pena.

Aos familiares, mãe por sempre me deixar livre pra eu escolher o que quiser ser, pai que, indiretamente ao ficar vendo programa de bichos quando era pequena me influenciou a fazer bio, aos irmãos Francisco, pelo incentivo às artes literárias, Thiago, por ser espelho de profissional de sucesso e Fernanda, que entrou na bio uma fase antes de mim, e pra qual sempre pude perguntar “o que cai na prova?”, e por ter lido e corrigido parte deste TCC! A Psiquê (*Felinus domesticus*), pelos ronrons, amassamentos de pão e brincadeiras pela casa, minha terapia!

A tudo que me ajuda, me guia, orienta, fortalece, ampara, acalma, incentiva, me renova, que tem o perfume do mel, a leveza do beija-flor, a claridade da água e a força do Sol, eu agradeço e peço a bênção.

Resumo

DE OLIVEIRA, Bianka Silva. **Avaliação *in vitro* do potencial de reprogramação celular de células musculares lisas de aorta em *Coturnix coturnix japonica* (codorna)**. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

Durante o desenvolvimento do zigoto em um organismo adulto gradualmente são formadas, a partir de células-tronco, células especializadas. Estas, no entanto, podem sofrer reprogramação celular, quando têm alteradas suas características específicas, podendo haver uma perda destas (desdiferenciação) e nova diferenciação (ou manter o estado desdiferenciado). Além disto, pode ocorrer uma passagem direta do fenótipo original a outro (transdiferenciação), o que ocorre geralmente entre tipos celulares com a mesma origem embrionária. Neste trabalho, utilizamos células musculares lisas de aorta de embriões de codorna com dez dias de incubação, para avaliar, sob condições distintas de cultivo celular (tempo e meio de cultura), uma possível reprogramação. Tendo em vista que as células estudadas provêm da crista neural (CN), focamos nossa atenção para uma reprogramação a alguns derivados desta. Utilizamos marcadores imunocitoquímicos característicos dos seguintes derivados de CN: célula muscular lisa (foi utilizado anti-SMA), célula glial de Schwann (anti-SMP), célula indiferenciada da CN (anti-HNK-1) e célula neuronal (anti-B-TUBIII). Cultivamos as células em quatro meios distintos, com um deles servindo de base para os outros três, por sua vez suplementados com fatores definidos. Observamos expressão de todos os marcadores testados em todos os meios de cultura, dentre aqueles com fatores definidos, no entanto, a presença de insulina em um dos meios foi um aspecto diferencial para a expressão de SMP. Fixamos as culturas celulares nos dias 1, 3 e 5 após o início desta, foi observada a expressão dos marcadores anti-SMA, anti-SMP e anti-HNK-1 nos dias 1, 3 e 5, enquanto a proteína B-TUBIII foi expressa apenas nos dias 3 e 5. Diminuição na marcação de anti-SMA ao longo dos dias e marcação para anti-HNK-1 sugerem que houve reprogramação celular por desdiferenciação, além disto, dupla marcação de células anti-SMP positivas com anti-SMA positivas indica que houve reprogramação por transdiferenciação nas células em cultura. Por fim, destacamos a derivação obtida, a partir das células musculares lisas, de células positivas para anti-B-TUBIII, o que até o momento não foi descrito a partir de nenhum outro derivado da CN.

Palavras-chave: reprogramação celular, célula muscular lisa de aorta, crista neural

Lista de Figuras

Figura 1.	Migração de células da crista neural truncal em aves, através de duas vias.....	2
Figura 2.	Hierarquia dos progenitores da CN cefálica, identificada em estudos <i>in vitro</i> com o modelo de codorna.....	3
Figura 3.	Modelo hipotético para ilustrar processos utilizados para a produção de células-tronco normais autólogas a partir de células somáticas mutantes.....	7
Figura 4.	Algumas etapas do isolamento celular.....	12
Figura 5.	Células musculares lisas em cultura.....	16
Figura 6.	Células com marcação positiva para anti-SMA (A), anti-SMP (B), anti-B-TUBIII (C) e anti-HNK-1 (D).....	17
Figura 7.	Células marcadas duplamente marcadas para anti-SMP/anti-SMA.....	18
Figura 8.	Porcentagem de células marcadas para anti-SMA de acordo com o meio e o dia de cultura.....	19
Figura 9.	Porcentagem de células marcadas para anti-HNK-1 de acordo com o meio e o dia de cultura.....	19
Figura 10.	Porcentagem de células marcadas para anti-SMP de acordo com o meio e o dia de cultura.....	20
Figura 11.	Porcentagem de células marcadas para anti-B-TUBIII de acordo com o meio e o dia de cultura.....	20
Figura 12.	Porcentagem de células duplamente marcadas para anti-SMP/anti-SMA de acordo com o meio e o dia de cultura.....	21
Figura 13.	Porcentagem de células marcadas para anti-SMA, anti-SMP, anti-B-TUBIII e anti-HNK-1 de acordo com o meio e o dia de cultura.....	23
Figura 14.	Caracterização da cultura muscular lisa com um, três e cinco dias.....	24
Figura 15.	Diferentes intensidades de marcação para anti-SMA.....	26
Figura 16.	Diferentes expressões de HNK-1, nos dias 1 (A) e 3 (B) de cultura.....	27
Figura 17.	Comparação da morfologia e marcações celulares apresentadas por células anti-SMA positivas (A) e células anti-B-TUBIII positivas (B).....	28

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Diferenciação Celular.....	2
1.2. Reprogramação Celular.....	5
1.2.1. Desdiferenciação.....	5
1.2.1.1. Desdiferenciação celular por transferência nuclear.....	5
1.2.1.2. Desdiferenciação celular por fusão celular.....	7
1.2.1.3. Pluripotencialidade induzida por fatores definidos.....	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos Específicos.....	10
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Animais.....	11
3.2. Isolamento de Células Musculares Lisas de Aorta.....	11
3.3. Cultura de Células Musculares Lisas.....	13
3.4. Análise Fenotípica por Imunocitoquímica.....	14
3.5. Análise dos Resultados.....	15
4. Resultados	16
4.1. Padronização de Método para Isolamento de Células Musculares Lisas de Aorta.....	16
4.2. Caracterização Fenotípica.....	16
4.2.1. Expressão de Marcadores Celulares.....	16
4.3. Influência dos Meios de Cultura Sobre a Reprogramação Celular.....	18
4.3.1. Influência dos meios de cultura sobre o número de células expressando cada marcador.....	18
4.3.2. Influência dos meios sobre a morfologia celular.....	22
4.4. Efeito do Tempo de Cultura.....	22
4.4.1. Efeito do tempo de cultura sobre o número de células marcadas.....	22
4.4.2. Efeito do tempo de cultura sobre a morfologia celular.....	24
5. Discussão	25
5.1. Estabelecimento da Cultura Celular.....	25
5.2. Reprogramação Celular.....	26
5.3. Efeito do meio de cultura e do tempo de cultivo na reprogramação celular.....	28
6. Conclusões	31
Referências	32

1. Introdução

Em organismos de reprodução sexuada, com a junção dos gametas feminino e masculino há a formação do chamado zigoto, também conhecido como célula-ovo - uma célula que dará origem a todas as outras que constituirão o organismo (Govindan *et al.*, 2007). O zigoto é considerado uma célula totipotente - potencialidade atribuída a células com um genoma capaz de direcionar a diferenciação de todas as linhagens celulares (embrionárias e extra-embrionárias) necessárias ao viável desenvolvimento de um indivíduo (Western, 2009). Esta potencialidade, em mamíferos, é encontrada unicamente no zigoto e em blastômeros precoces (Jaenisch *et al.*, 2008). No entanto, existem outras células que, apesar de não serem dotadas desta potencialidade total, possuem a capacidade de se dividir e direcionar a diferenciação celular para mais de um fenótipo, sendo classificadas como:

- Pluripotentes: células com habilidade para formar todas as linhagens celulares do corpo, mas que não formam os anexos embrionários, como as células-tronco embrionárias (Jaenisch *et al.*, 2008).
- Multipotentes: células com habilidade para formar diversos tipos celulares, no entanto restritos a uma sub-população celular, como as células-tronco hematopoiéticas (Jaenisch *et al.*, 2008).

Existem, ainda, células classificadas como unipotentes, por possuírem a potencialidade para formar somente um fenótipo, sendo este o caso das células espermatogênicas, que originam unicamente espermatozóides (Jaenisch *et al.*, 2008). A potencialidade celular é um dos aspectos avaliados para a caracterização de células-tronco, que são definidas pela potencialidade para se diferenciar em mais de um tipo celular especializado e pela habilidade de se auto-renovar indefinidamente (Lerou *et al.*, 2005). Durante o desenvolvimento de um indivíduo, algumas destas células passam pelo processo de diferenciação celular.

1.1. Diferenciação Celular

Durante o processo de diferenciação celular, observa-se uma seqüência de modificações morfológicas, químicas e funcionais que transformam a célula-tronco em uma célula diferenciada, com funções diferentes e mais específicas do que as realizadas inicialmente (Junqueira *et al.*, 2005). Este processo é um mecanismo importantíssimo, que ocorre ao longo de toda a vida do indivíduo, originando os mais diversos tipos celulares adequados à execução de atividades que tecidos e órgãos necessitam para que o desenvolvimento, crescimento e manutenção do corpo ocorram de maneira adequada (Wolpert *et al.* 2008).

Existem diversos fatores que influenciam a determinação do tipo celular para o qual se diferenciara uma célula, contudo, a maioria destes acaba se relacionando ao controle da transcrição gênica (Kumar *et al.*, 2003). Exemplos interessantes de dinâmica da diferenciação celular ocorrem com as células da crista neural (CN).

As células da CN são células embrionárias neuroepiteliais que passam por uma transição epitélio-mesenquimal, migram pelo embrião por determinadas rotas (Figura 1) e formam uma grande variedade de derivados, como neurônios periféricos e glia, células de pigmento, cartilagem craniofacial, músculo liso e células endócrinas, dentre outros (Baker, 2008).

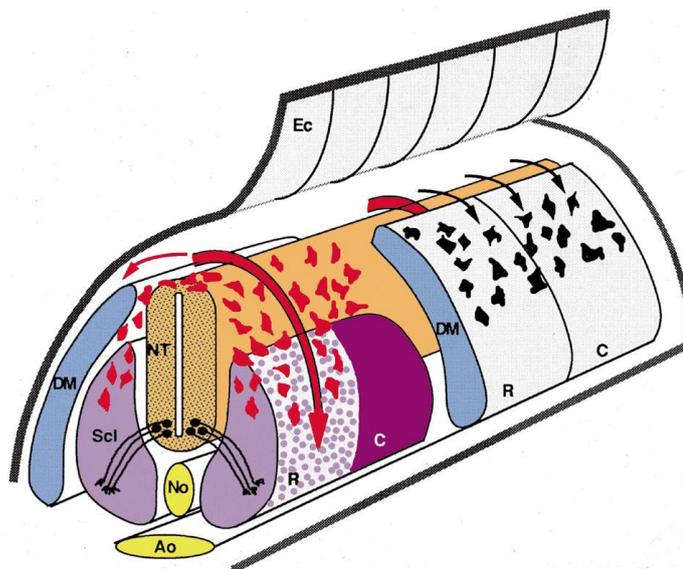


Figura 1: Migração de células da crista neural truncal em aves, através de duas vias. As células da CN (em vermelho e preto) emergem pela face dorsal do tubo neural (NT). Uma subpopulação migra ventromedialmente, apenas pela face rostral (R) e não pela caudal (C) dos somitos (compostos por Scl e DM), enquanto outra (em preto) migra dorsolateralmente, tanto pela face rostral como pela caudal dos somitos. DM, dermomiótomo; Scl, esclerótomo; No, notocorda; Ao, aorta; Ec, ectoderme; NT, tubo neural; R, rostral; C, caudal. Adaptado de Krull, 2001.

As células migratórias da CN correspondem a uma coleção heterogênea de progenitores (Figura 2), incluindo células multipotentes e precursores com a potencialidade já restrita. A influência de sinais do microambiente é crucial para assegurar que as células derivadas da CN expressem um fenótipo correspondente com sua localização (Dupin *et al.*, 2003).

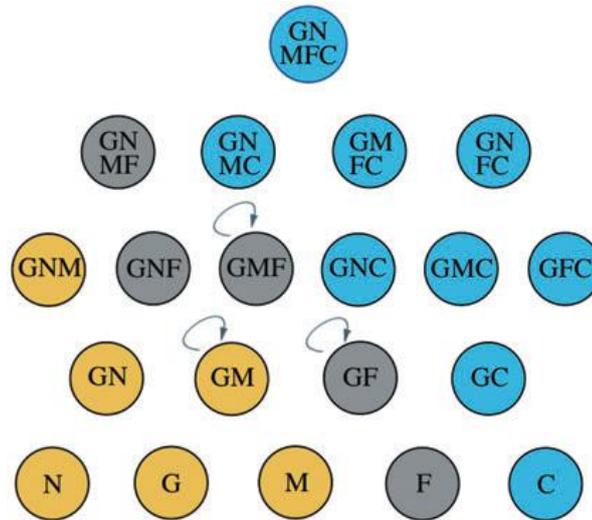


Figura 2: Hierarquia dos progenitores da CN cefálica, identificada em estudos *in vitro* com o modelo de codorna. Neste esquema, é mostrada a existência de progenitores intermediários no processo de diferenciação celular, que parte do progenitor com maior potencialidade, GNMFC, até chegar a células comprometidas com o único fenótipo que representam: neurônio (N), célula glial (G), melanócito (M), célula muscular lisa (F) e condrócito (C). Em azul, progenitores condrogênicos; em cinza, progenitores fibroblastóides; em amarelo, progenitores neurais. As flechas recurvadas indicam que os progenitores para os quais apontam se auto-renovam, sendo considerados células-tronco. Adaptado de Le Douarin, 2008.

O modelo acima (Figura 2) mostra um progenitor celular com maior potencial para gerar diferentes fenótipos: glia (G), neurônio (N), melanócito (M), célula muscular lisa (F) e condrócito (C), a partir do qual surgem outros progenitores celulares (sendo GM e GF considerados células-tronco, por se auto-renovarem (Trentin *et al.*, 2004)) com potencialidade cada vez mais restrita, até chegar a uma célula diferenciada, já comprometida com o único fenótipo que expressa. Esse processo de diferenciação ocorre de maneira muito específica, sendo diretamente dependente de fatores intrínsecos às células e de moléculas sinalizadoras que as células da CN encontram durante o processo de migração (Le Douarin, 2008). Quais fatores poderiam estar envolvidos nesta crescente diferenciação celular?

Os progenitores da CN são especificados, durante o desenvolvimento embrionário, por mudanças nas condições do ambiente por onde a célula está

migrando, bem como por transformações e modulações das próprias células (Le Douarin *et al.*, 2004). Por exemplo, evidências indicam que a ativação da via de sinalização Notch em células-tronco da CN inibe a formação neuronal e promove a diferenciação para células gliais. Quando uma célula-tronco da CN entra na rota de diferenciação sob influência de sinais neurogênicos como aqueles desencadeados pela proteína morfogenética óssea tipo 2 (fator ambiental), por exemplo, ela passa a se diferenciar para neuroblasto. Tendo diferenciado para neuroblasto, ela passa a expressar moléculas que ativarão a via Notch nas células da CN ao seu redor, impedindo-as de também se desenvolverem como neuroblastos e induzindo sua diferenciação para o fenótipo glial (Wolpert *et al.*, 2008).

Alguns fatores envolvidos na diferenciação da CN parecem restringir progenitores multipotentes (como GNM, GMF, GF, etc.) a derivados específicos como G, N ou F, por exemplo. Outros fatores parecem agir seletivamente, afetando a proliferação ou a sobrevivência de determinados progenitores da CN (Dupin *et al.*, 2001). Como exemplo deste último caso, observou-se recentemente que a utilização de fibronectina como matriz extracelular em culturas de células da CN favorece a diferenciação destas ao fenótipo muscular liso, ao aumentar a proporção de progenitores unipotentes e oligopotentes comprometidos com este fenótipo (Costa-Silva *et al.*, 2009).

Outro interessante caso relacionado à diferenciação celular pode ser encontrado na relação entre células endoteliais e células musculares lisas de vaso (CMLV). Experimentos demonstraram que células endoteliais são capazes de promover a diferenciação da linhagem celular progenitora de CMLV 10T1/2 para o fenótipo muscular liso (Rzucidlo *et al.*, 2007). Também já foi demonstrado que células endoteliais são capazes de promover, *in vitro*, a diferenciação do fenótipo de CMLV em cultura, o qual não é funcional, para o fenótipo capaz de contração (Rzucidlo *et al.*, 2007).

Concluindo, o processo de diferenciação de uma célula é algo complexo onde estão envolvidos inúmeros agentes. Kumar e colaboradores (2003) relataram em artigo mais de trinta fatores de transcrição que parecem estar envolvidos na proliferação e diferenciação de células musculares lisas. O que muitos cientistas se perguntaram é se todo este processo de diferenciação é permanente e irrevogável, ou se haveria a possibilidade de uma célula ter seu fenótipo alterado. A resposta é que sim, ela pode, através de um processo conhecido como reprogramação celular.

1.2. Reprogramação Celular

Durante o desenvolvimento do zigoto em um organismo adulto gradualmente são formadas células especializadas. Normalmente este processo é irreversível, sendo as células comprometidas com seu destino - uma célula da pele, por exemplo, não se converte ou origina comum e continuamente uma célula neural (Gurdon *et al.*, 2008). No entanto, o desenvolvimento depende mais de eventos epigenéticos do que de genéticos, sendo por este motivo esperado que a diferenciação celular possa ser revertida (Yu *et al.*, 2007), já que potencialmente qualquer célula com o genoma íntegro poderia ter sua expressão gênica regulada de modo a se formar qualquer tipo celular existente no indivíduo. De fato, já se sabe que células especializadas podem ter seu “programa de desenvolvimento” alterado – processo ao qual se dá o nome de reprogramação celular e que será exemplificado a seguir, através de exemplos de dois tipos de reprogramação celular: desdiferenciação e transdiferenciação.

1.2.1. Desdiferenciação

A desdiferenciação celular é caracterizada por uma perda das características específicas do tipo celular ao qual pertencia a célula, podendo esta posteriormente sofrer nova diferenciação - inclusive para outros fenótipos, dependendo do quanto a diferenciação foi revertida e de quanta potencialidade foi ganha - ou ainda manter seu estado desdiferenciado (Blelloch, 2008). Atualmente existem três métodos mais estudados através dos quais se observa este fenômeno: transferência nuclear, fusão celular e pluripotencialidade induzida por fatores definidos.

1.2.1.1. Desdiferenciação celular por transferência nuclear

O procedimento utilizado para a transferência nuclear (TN) envolve basicamente duas células, uma doadora do núcleo e outra receptora deste. A célula receptora geralmente é um oócito (podendo ser também um zigoto), do qual é retirado o núcleo para que receba o núcleo da célula doadora, que geralmente é uma célula somática adulta ou uma célula provinda de uma linhagem cultivada (Hadjantonakis *et al.*, 2002). Para maiores detalhes sobre a metodologia, pode-se consultar Egli *et al.*, 2006 e Li *et al.*, 2006.

Utilizando-se esta técnica, pode-se desdiferenciar o núcleo da célula somática até a totipotência, permitindo que ela dê origem a um novo indivíduo, que será um

clone do indivíduo que a doou – no entanto, o maior interesse almejado com esta técnica é a formação de células-tronco (maiores detalhes na Figura 3) (Hadjantonakis *et al.*, 2002). Dentre animais que já foram clonados, encontram-se os bovinos, ratos, coelhos, gatos e cães (Yamanaka, 2008).

O oócito é utilizado por ser a única célula do corpo adulto que pode reprogramar uma célula somática plenamente diferenciada à totipotência, sendo requerida para isto uma série de eventos moleculares que levam a uma deleção total dos padrões de expressão gênica do núcleo doador (Chung *et al.*, 2009). Em mamíferos, durante este processo, observa-se o aumento massivo do volume nuclear em cerca de trinta vezes, a descondensação da cromatina e a remoção de marcadores de diferenciação, como metilações do DNA (Gurdon *et al.*, 2008). O princípio geral deste processo parece ser que, durante sua formação, oócitos (e também o zigoto) adquirem concentrações muito altas de certas proteínas que induzem os efeitos supracitados (Gurdon *et al.*, 2008). Ainda que não se tenha um completo entendimento de como ocorre este processo e de quais proteínas estão envolvidas nele, recentemente alguns fatores de transcrição (Oct4, Sox2 e LIN28) presentes no oócito, foram relatados como sendo cruciais para a desdiferenciação ou como sendo potencializadores deste fenômeno (Welstead *et al.*, 2008).

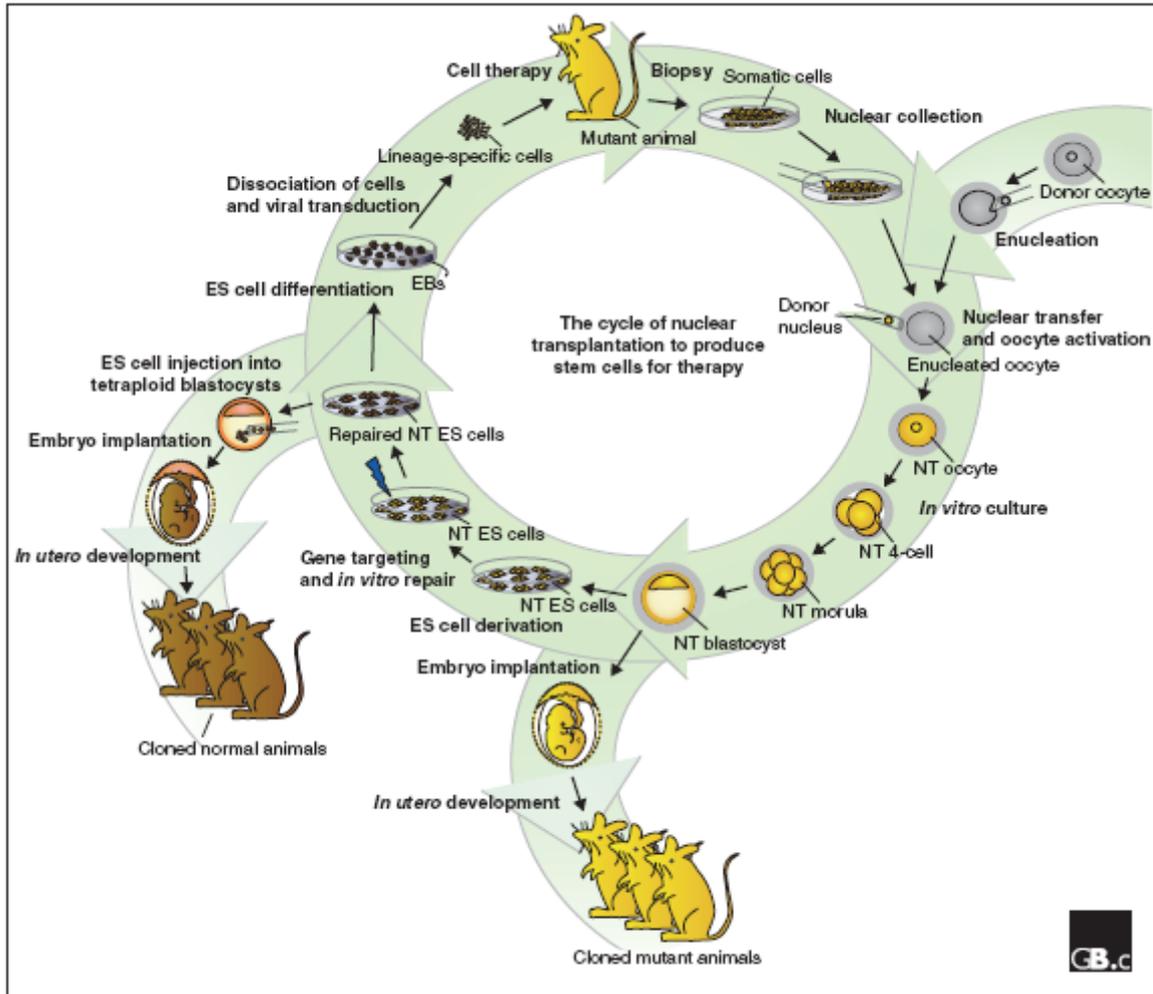


Figura 3: Modelo hipotético para ilustrar processos utilizados para a produção de células-tronco normais autólogas a partir de células somáticas mutantes. Primeiramente, mostras de biópsias são obtidas do animal mutante e cultivadas *in vitro*. Oócitos enucleados (oócitos que tiveram o núcleo retirado) no estágio de metáfase II recebem o núcleo da célula somática mutante. Após esta TN, o oócito é ativado e inicia-se a embriogênese. Os embriões gerados se desenvolvem *in vitro* até o estágio de blastocisto e para que o desenvolvimento continue, este deve ser introduzido no útero de uma fêmea, onde se desenvolve até o nascimento do clone mutante. Alternativamente, células-tronco embrionárias pluripotentes podem ser derivadas do blastocisto gerado por TN, tratadas *in vitro* sob condições adequadas e submetidas a tratamento para a correção da mutação que possuem. Posteriormente estas células são introduzidas em blastocistos que, quando implantados no útero da fêmea, continuam o desenvolvimento e podem gerar uma progênie de clones normais. Alternativamente, células-tronco embrionárias derivadas de TN podem se diferenciar *in vitro* para a obtenção de uma linhagem específica de células-tronco autólogas, que se diferenciem para o tipo celular necessário ao tratamento do mutante. Adaptado de Hadjantonakis *et al.*, 2002.

1.2.1.2. Desdiferenciação celular por fusão celular

A importância da fusão celular durante o desenvolvimento é demarcada por seu envolvimento em uma ampla gama de processos biológicos, como na fertilização, no desenvolvimento de músculos, ossos e placenta e na resposta imune, entre outros (Chen *et al.*, 2005). Também é através da fusão celular que

células pluripotentes são utilizadas para reprogramar células somáticas, levando-as à desdiferenciação. Assim como no caso da transferência nuclear, as células envolvidas na fusão celular normalmente são: oócito (ou zigoto) e célula diferenciada, que tem sua fusão estimulada por tratamentos *in vitro*. Também como ocorrido na transferência nuclear, sabe-se que fatores nucleares presentes no oócito podem eliminar alterações epigenéticas do genoma da célula somática, levando-a à pluripotência - evidenciada pela ativação de marcadores típicos deste estado, inativação de marcadores tecido-específicos e pela ausência de modificações epigenéticas no núcleo da célula somática reprogramada (Do *et al.*, 2009).

1.2.1.3. Pluripotencialidade induzida por fatores definidos

Com ciência dos processos anteriormente descritos, e considerando que oócitos e células-tronco contêm fatores que conferem totipotencialidade ou pluripotencialidade a células somáticas, Takahashi e Yamanaka (2006), em trabalho de referência na área, conseguiram induzir a pluripotencialidade em fibroblastos de camundongos adultos. Para tanto, induziram a transcrição de quatro fatores (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4), que são normalmente transcritos por células pluripotentes, verificando que a indução destes fatores em fibroblastos diferenciados reprogramava estas células a um estado pluripotente, criando o que eles chamaram de célula-tronco pluripotente induzida (CTPI) (Takahashi *et al.*, 2006). Em trabalho posterior, utilizando os mesmos fatores, estes pesquisadores foram capazes de gerar CTPI a partir de fibroblastos dermais humanos, mostrando que as células-tronco induzidas eram similares a células-tronco embrionárias humanas tanto em morfologia, quanto na taxa de proliferação, expressão gênica e de antígenos de superfície e atividade da telomerase (Takahashi *et al.*, 2007).

Sobre os papéis de cada um destes fatores na indução da pluripotência, especula-se que os oncogenes c-Myc e Klf4 aumentem e acelerem significativamente o processo, no entanto são prescindíveis para a indução, o fator de transcrição Sox2 contribui para a pluripotência por regular os níveis de Oct4, e este fator de transcrição, por fim, é considerado como o possível único fator obrigatório na indução da pluripotência, responsável por iniciar a reprogramação celular (Jaenisch *et al.*, 2008).

1.2.2. Transdiferenciação

A transdiferenciação celular é caracterizada por uma mudança direta - sem passar por um estágio desdiferenciado - de uma célula diferenciada a um fenótipo diferente (Eberhard *et al.*, 2008), ocorrendo normalmente entre células que descendem de uma mesma região do embrião (Thowfeequ *et al.*, 2007). Esta conversão fenotípica pode ser induzida *in vitro* por fatores de crescimento, agentes químicos ou por manipulação de expressão gênica (Real *et al.*, 2005).

Dois exemplos de transdiferenciação, mostrando tanto o papel de uma indução *in vitro*, quanto à ocorrência de transdiferenciação entre células com uma mesma ascendência, serão dados através de células derivadas de crista neural de codorna. Em um estudo verificou-se que células pigmentadas e células gliais de Schwann - ambas derivadas de CN - podem converter-se, *in vitro*, uma na outra, quando expostas ao sinal mitogênico de endotelina-3 (ET-3), gerando um tipo celular intermediário, que expressa marcadores celulares típicos dos dois fenótipos (Dupin *et al.*, 2003). Em outro estudo, conduzido tanto *in vitro* como *in vivo*, observou-se que o fenótipo de músculo liso (derivado de CN) surge a partir de células de Schwann, mesmo sem a indução de ET-3 (Real *et al.*, 2005). Estes exemplos sugerem que a diferenciação de células da CN pode ser revertida, resultando em uma transdiferenciação entre linhagens de CN (Real *et al.*, 2005).

Estes estudos, como os demais, revelam-nos a importância de desenvolvermos nossa compreensão sobre esse processo tão fundamental e altamente dinâmico que é a diferenciação/reprogramação celular - colocadas lado a lado por serem apenas pontos diferentes (e opostos) de um mesmo caminho, utilizando os mesmos mecanismos e recursos deste. Inspirados neste aspecto da biologia celular, desenvolvemos este trabalho para investigar o potencial de reprogramação celular das células musculares lisas do arco aórtico, com o intuito de contribuir com o conhecimento desta área, o qual é importante para pesquisas que trabalham com a derivação de células-tronco a partir de células diferenciadas, que têm em vista a terapia celular. Além disto, utilizamos estas células por possuírem como origem embrionária a CN, pois nos trabalhamos até então publicados sobre reprogramação celular e plasticidade celular das células derivadas da CN, ainda não se partiu da célula muscular lisa. O modelo animal utilizado foi o de codorna, por se tratar do modelo clássico de estudos em CN, além de se tratar de um animal de fácil manutenção e por apresentar a praticidade de obtenção de embriões.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o potencial de reprogramação celular em células musculares lisas de aorta, utilizando para tanto o modelo animal de codorna (*Coturnix coturnix japonica*).

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar um método de isolamento de células musculares lisas, derivadas de arco aórtico de embriões de codorna com 10 dias de incubação.
- Identificar possíveis alterações fenotípicas nas culturas de células musculares lisas de aorta por imunocitoquímica, através de marcadores de células musculares lisas, células gliais, células neuronais e células indiferenciadas da CN.
- Verificar a potencial influência de diferentes fatores de crescimento e hormônios utilizados nos meios de cultura celular. Estabelecendo se dentre estes há algum que favoreça a ocorrência de reprogramação celular ou se há algum que direcione as células reprogramadas a um fenótipo específico, dentre aqueles reconhecidos pelos marcadores imunocitoquímicos.
- Avaliar a influência do tempo de cultivo celular no surgimento e na manutenção da expressão dos diferentes marcadores celulares verificados por imunocitoquímica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) com 10 dias de incubação (estágio em que a aorta está recém-formada) a 37,5°C (em chocadeira com umidade relativa de 65%) para a obtenção de células musculares lisas da aorta. Os ovos fertilizados foram obtidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular (LNH) da Universidade Federal de Santa Catarina, onde os animais são mantidos em ciclo de claro/escuro, com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC sob o protocolo de pesquisa/ensino número PP00103.

3.2. Isolamento de Células Musculares Lisas de Aorta

Desenvolvemos neste trabalho um método para o isolamento de células musculares lisas da túnica íntima de aorta torácica de embriões de codorna com 10 dias de incubação. O processo foi realizado sob observação em microscópio estereoscópico (ME) (Olympus). Para tanto, os ovos de codorna foram abertos em sua parte apical com uma tesoura de ponta recurvada. Cada embrião foi transferido para uma placa de Petri contendo solução salina tamponada de fosfato (PBS - pH 7,6), sendo imediatamente sacrificado. Após repetir o procedimento para todos os embriões, seus corpos foram transferidos para outra placa de Petri, contendo PBS suficiente para sua completa imersão (Figura 4A), sendo posteriormente, um a um, imobilizados com agulhas entomológicas de tungstênio (Figura 4B e 4C).

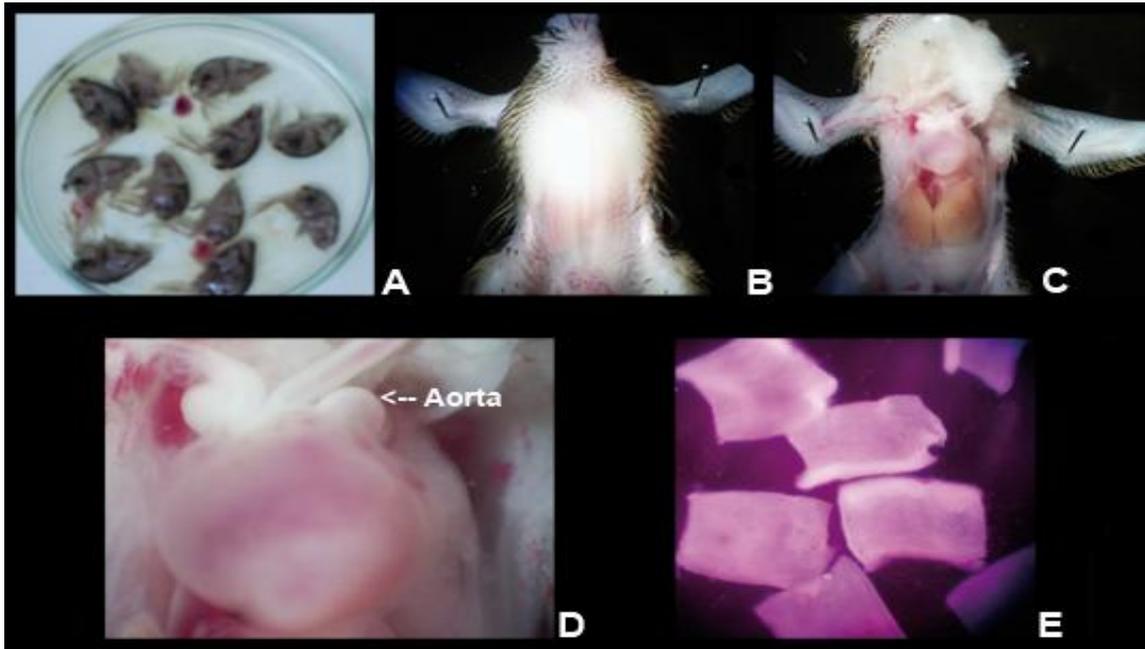


Figura 4: Algumas etapas do isolamento celular. (A) Embriões recém decapitados, imersos em PBS na placa de Petri, (B) Embrião imobilizado na placa de Petri com fundo de resina (em PBS, visualização ao ME), (C) Embrião com região torácica ventral aberta, revelando o coração (em PBS, visualização ao ME), (D) Coração visto em maior aumento e (E) Aortas já cortadas, mostrando uma superfície de exposição maior ao tratamento enzimático (em α -MEM, visualização ao ME).

Com uma tesoura cirúrgica foi feita uma incisão entre a região torácica e a abdominal, continuando a linha do corte pelas duas laterais do corpo, até que se conseguisse levantar a parte torácica do animal com uma pinça, expondo assim o coração (Figuras 5C e 5D). A seguir, com o uso de duas pinças, foram retirados da aorta os tecidos que a envolvem, no intuito de isolar apenas a túnica média, onde se localizam as células musculares lisas. Após este procedimento, foram feitos dois cortes, um próximo ao coração e o outro na porção mais distal da aorta. A seguir, esta foi retirada com uma pinça e colocada em um recipiente pequeno de vidro, contendo 1,6 mL do meio de cultura “meio mínimo essencial modificado alfa (α -MEM) (Gibco).

Em cada aorta foi feito um corte longitudinal com uma pequena tesoura, de modo que se abrissem, convertendo-se em estruturas planas e não mais em forma de tubo, o que aumenta a área de superfície para o tratamento enzimático que se segue (Figura 4E). Para este, o meio onde estavam as aortas foi retirado e substituído por uma solução de pancreatina (6,25g/L, Sigma) diluída na proporção de 1:3 em meio α -MEM, por 5 minutos, à temperatura ambiente, para retirada das

células endoteliais. Após este período, a solução de pancreatina foi retirada e as aortas lavadas com meio α -MEM, para que fossem retiradas possíveis células endoteliais ainda presentes no meio, restando apenas o tecido de células musculares lisas.

Em seguida, foi feita nova incubação com pancreatina, nas mesmas condições, porém por 10 minutos, para dar início à dissociação do tecido muscular, a qual foi intensificada pela fragmentação do tecido em pequenos pedaços. Após este procedimento, o meio com pancreatina e fragmentos de tecido foi retirado e colocado em um tubo de centrífuga de 15 ml (Corning), contendo solução de tripsina-EDTA (a 0,25%, Sigma) em diluição de 1:1, permanecendo por 10 minutos, à temperatura ambiente, para o isolamento celular. Após este período, foi adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab) para bloquear a reação e o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300 μ l de meio α -MEM. A suspensão de células foi quantificada em câmara de Neubauer, sob observação ao microscópio de contraste de fase (Olympus CK40).

3.3. Cultura de Células Musculares Lisas

As células musculares lisas, após isoladas pelo procedimento acima descrito, foram cultivadas *in vitro*. Para tanto, foram semeadas a uma densidade de 42 células/mL, em poços de placas de cultura de 24 poços (Corning) contendo 600 μ L de meio de cultura celular. Os poços onde as células foram cultivadas foram previamente tratados com colágeno I (Gibco), para facilitar a adesão celular. Utilizamos quatro meios de cultura:

- Meio 1, “ **α -MEM básico**”: α -MEM com penicilina (200 U/mL ; Sigma) e estreptomicina (10 μ g/mL ; Sigma) suplementado com 10% de SFB e 2% de extrato de embrião (EE) de galinha (produzido pelo próprio laboratório).
- Meio 2, “ **α -MEM básico com insulina**”: α -MEM básico suplementado com Insulina (10 μ g/mL ; Sigma).

- Meio 3, “ **α -MEM completo**”: α -MEM básico acrescido de hormônios e fatores de crescimento: Transferrina (10 μ g/mL ; Sigma), Hidrocortizona (0,1 μ g/ mL ; Sigma), Glucagon (0,01ng/ mL ; Sigma), Insulina (1ng/ mL ; Sigma), T₃ (0,4ng/ mL ; Sigma), EGF (0,1ng/ mL ; Sigma) e FGF2 (1ng/ mL ; Sigma)
- Meio 4, “ **α -MEM completo com insulina**”: “ α -MEM completo” + Insulina (10 μ g/mL)

As células foram mantidas em estufa úmida (Revco) à 37°C , 5% de CO₂ e 95% de umidade, o meio foi renovado a cada dois dias. As células foram fixadas no próprio poço de cultura, a fixação das culturas ocorreu nos dias 1, 3 e 5 de cultivo, com paraformaldeído 4% (PAF) (Vertec) aplicado nas células do poço de cultura durante 30 minutos. Após este período, o PAF foi retirado e o poço de cultura lavado 3 vezes com PBS. As células foram mantidas no poço onde foram cultivadas nesta solução até a realização da imunocitoquímica para identificação dos fenótipos presentes.

3.4. Análise Fenotípica por Imunocitoquímica

A expressão de alguns marcadores celulares pelas células presentes em cultura foi realizada através da análise fenotípica por imunocitoquímica. Procuramos identificar quatro marcadores característicos dos seguintes tipos celulares: célula glial de Schwann, célula muscular lisa, célula neuronal e célula indiferenciada da CN.

As células com características gliais foram identificadas com o anticorpo IgG1 de camundongo anti-proteína específica da bainha de mielina (anti-SMP), específico para célula de Schwann (1:200; gentilmente cedido pela Profa. Nicole Le Douarin) (Dupin *et al.*, 2003; Real *et al.*, 2005). As células musculares lisas foram identificadas com o anticorpo IgG2a de camundongo anti-alfa actina de músculo liso (anti-SMA) (1:800; Sigma) (Real *et al.*, 2005; Yun *et al.*, 2009), as células neuronais foram marcadas com o anticorpo IgG1 de camundongo anti-tubulina tipo beta III (anti-B-TUBIII) (1:2000; Promega) (Katsetos *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007) e as células com características de CN indiferenciadas foram reconhecidas pelo anticorpo IgM de camundongo anti-*Human Natural Killer* (anti-HNK-1) (1:20;

hibridoma gentilmente cedido pela Profa. Nicole Le Douarin) (Real *et al.*, 2006). Foram utilizados anticorpos secundários anti-IgG1 (1:100; Southern Biochnology), anti-IgG2a (1:75; Southern Biochnology) ou anti-IgM (1:100; Southern Biochnology) de camundongo conjugados ou a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou a *Texas Red* (TXRD), para marcações em verde e vermelho, respectivamente. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS.

A imunocitoquímica foi realizada à temperatura ambiente, diretamente sobre as células fixadas nos poços da placa de cultura celular. Primeiramente as células foram permeabilizadas com solução de PBS contendo 0,25% de Triton X-100 (Sigma) por 20 minutos, para permitir aos anticorpos o acesso aos antígenos citoplasmáticos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB diluído em PBS durante 30 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 1 hora, com os anticorpos primários. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário correspondente durante uma hora. Posteriormente, foi feita incubação com o corante nuclear DAPI (1µg/ml; Sigma) por 1 minuto e, a seguir, as células foram lavadas com água destilada. Por fim, as células foram cobertas com glicerina (Merck) tamponada (pH 9,0) e observadas ao microscópio epifluorescente invertido (Olympus IXT1), avaliando-se a presença/ausência e freqüência dos fenótipos para os quais foram feitas a imunocitoquímica, além de serem obtidas imagens das células através do sistema de captura de imagem (Olympus DP71).

3.5. Análise dos Resultados

A área do poço onde foram semeadas as células foi analisada, observando a morfologia celular e anotando os fenótipos marcados para anti-SMA, anti-SMP, anti-HNK-1 e anti-B-TUBIII. A quantificação da marcação foi classificada em 7 níveis possíveis, onde 0 corresponde a nenhuma marcação (0%) e 7 a virtualmente 100% das células marcadas para o fenótipo analisado. A determinação destes níveis deu-se por estipulação visual do observador. Analisaram-se estatisticamente os dados pelo método ANOVA de duas vias, com o auxílio do programa *Graphpad Prism 4*. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O número de repetições para as culturas foi de 4 para culturas fixadas no dia 1 (com exceção do resultado para o marcador SMP, que teve “n” igual a 1), de 5 para culturas fixadas no dia 3 e de 3 para culturas fixadas no dia 5.

4. Resultados

4.1. Padronização de Método para Isolamento de Células Musculares Lisas de Aorta

O protocolo desenvolvido (apresentado na metodologia) para o isolamento de células musculares lisas de vaso de aorta, em *Coturnix coturnix japonica*, foi bem sucedido. As células foram isoladas das demais que compõe a aorta, foram cultivadas e aderiram bem ao substrato (Figura 5A), apresentando rápido aumento da densidade celular ao longo dos dias. Já no dia 5 de cultura percebe-se uma monocamada de células cobrindo quase inteiramente o poço da placa de cultura (Figura 5B).

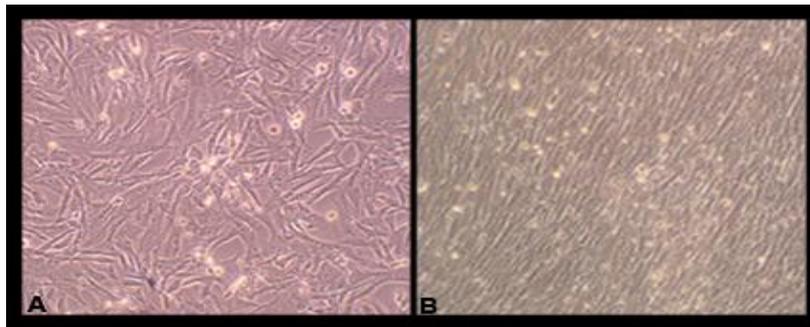


Figura 5: Células musculares lisas em cultura. Percebe-se que as células aderiram e proliferaram com sucesso. Em A, dia 3 de cultivo e em B, dia 5. Aumento de 200 vezes.

4.2. Caracterização Fenotípica

4.2.1. Expressão de Marcadores Celulares

Observamos a presença de células positivas para todos os marcadores celulares analisados: anti-SMA, anti-SMP, anti-B-TUBIII e anti-HNK-1 (Figura 6). A porcentagem de células marcadas foi variável de acordo com o meio e o dia de cultura (o que será apresentado adiante). Abaixo (Figura 6), apresentamos imagens das quatro marcações.

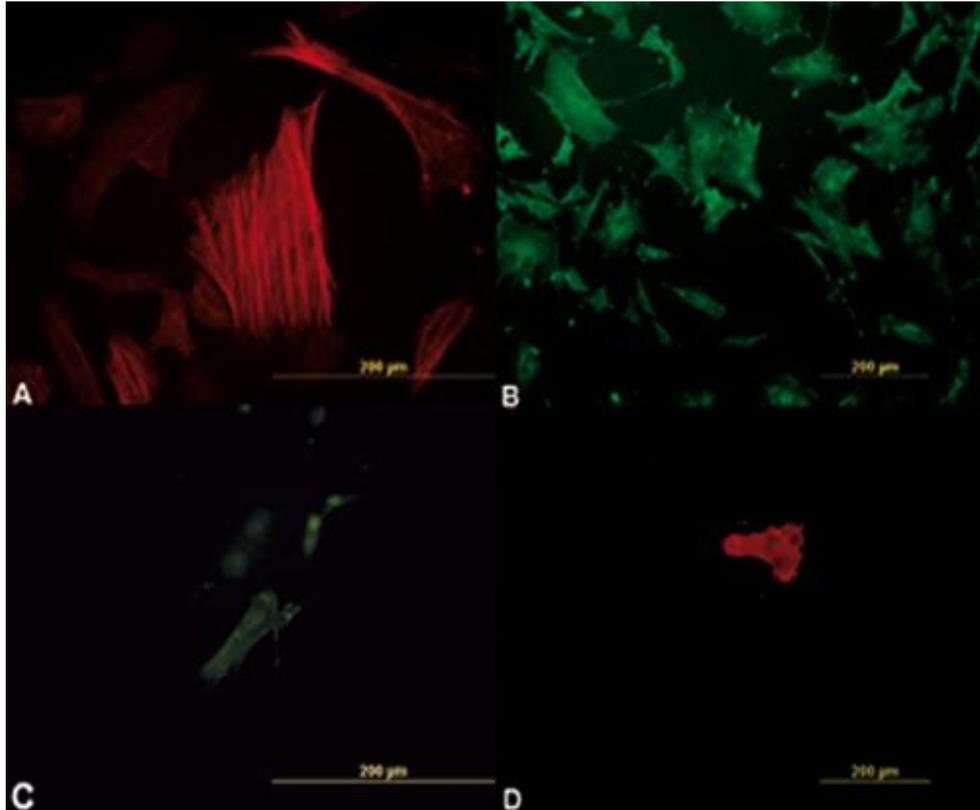


Figura 6: Células com marcação positiva para anti-SMA (A), anti-SMP (B), anti-B-TUBIII (C) e anti-HNK-1 (D). Em nossos experimentos visualizamos todos os marcadores para os quais foi feita a imunocitoquímica, notar a morfologia celular semelhante em todas as marcações. A linha amarela para referência de tamanho mede 200 μm em todas as imagens. Em A e C o aumento é de 400 vezes, em B e D é de 200 vezes.

Analizamos também, nas células marcadas para anti-SMP, se apresentavam dupla marcação para anti-SMA. Isto foi observado, abaixo (Figura 7), exibimos imagens desta dupla marcação

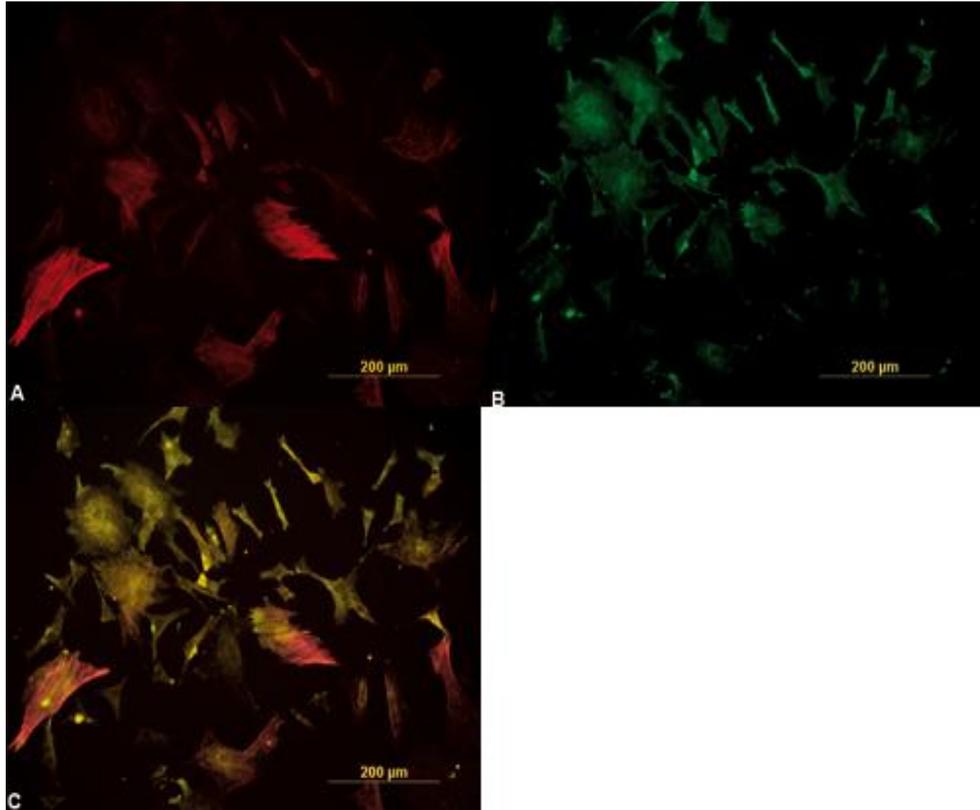


Figura 7: Células marcadas duplamente marcadas para anti-SMP/anti-SMA. Em A, marcação apenas para anti-SMA, em B apenas para anti-SMP, em C, sobreposição das marcações (em amarelo). Pode-se perceber pela imagem C que há células marcadas em sua totalidade para ambos marcadores, enquanto algumas outras parecem expressar muito SMA, com a expressão de SMP em apenas algumas regiões. Aumento de 200 vezes.

4.3. Influência dos Meios de Cultura Sobre a Reprogramação Celular

4.3.1. Influência dos meios de cultura sobre o número de células expressando cada marcador

Como mostrado nos gráficos que se seguem, em todas as culturas, independentemente do meio utilizado, foram encontradas marcações para todos os fenótipos analisados. Além disto, a variação no número de células marcadas para cada fenótipo, ao longo dos dias, foi similar em todos os meios, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Na Figura 8 percebe-se que em todos os quatro meios utilizados foram encontradas marcações para o fenótipo de músculo liso. Nenhum meio apresentou um diferencial no número de células marcadas. Ressaltamos ainda que no dia 1 de cultura, nem todas as células foram marcadas para anti-SMA.

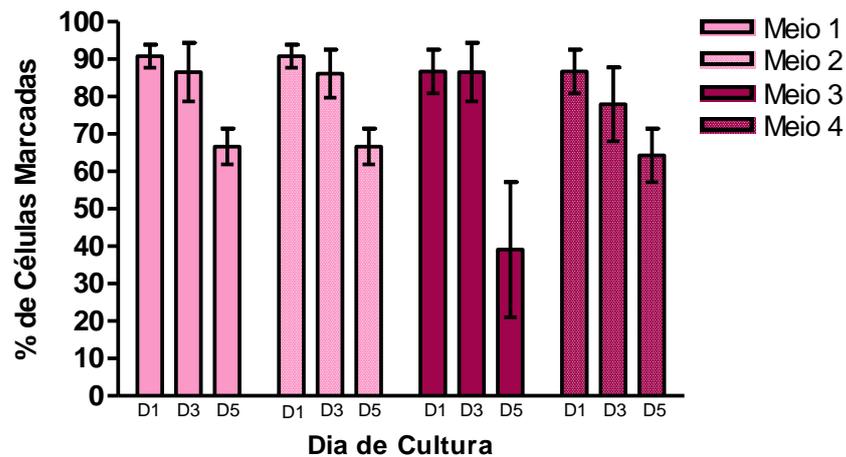


Figura 8: Porcentagem de células de células marcadas para anti-SMA de acordo com o meio e o dia de cultura.

Na Figura 9, mostramos a expressão de HNK-1. Assim como foi observado para o marcador anti-SMA, HNK-1 foi expresso em todos os meios de cultura, não apresentando variação significativa em nenhum deles.

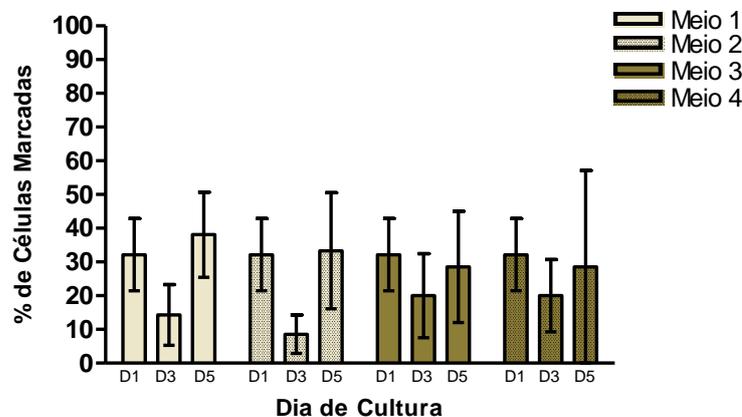


Figura 9: Porcentagem de células marcadas para anti-HNK-1 de acordo com o meio e o dia de cultura.

A seguir, na Figura 10, vemos que em todos os meios utilizados foram observadas células marcadas para anti-SMP. Cabe, no entanto, chamar a atenção para o fato de que, no dia 1 de cultura, apenas no meio 4 foi possível visualizar esta marcação. O efeito dos meios não foi tão padronizado como ocorreu com os outros marcadores, mas, ainda assim, não foram acusadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados.

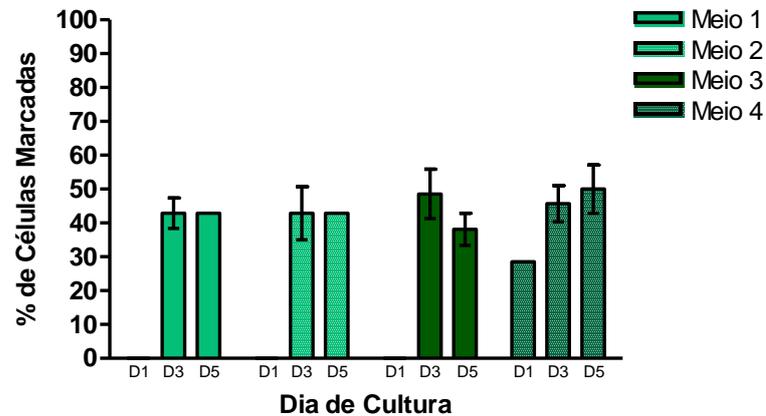


Figura 10: Porcentagem de células de células marcadas para anti-SMP de acordo com o meio e o dia de cultura.

Finalmente, com a Figura 11, podemos analisar a presença de células marcadas para anti-B-TUBIII nos quatro meios de cultura. A expressão de B-TUBIII, distintamente do que foi apresentado até o momento, não foi observada em nenhum meio no dia 1 de cultura, aparecendo somente no dia 3, em todos os meios de cultura. Sendo que no dia 5 o número de células expressando B-TUBIII aumentou aproximadamente 3 vezes para o meio 1 e 2 vezes para os meios 2, 3 e 4.

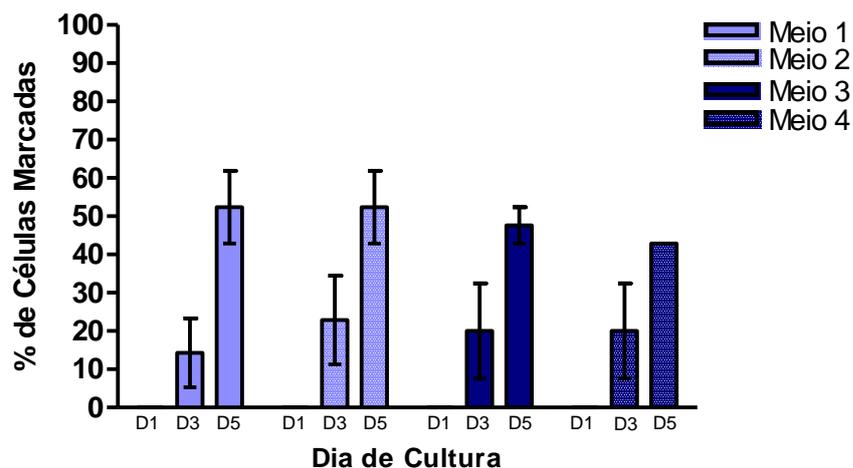


Figura 11: Porcentagem de células de células marcadas para anti-B-TUBIII de acordo com o meio e o dia de cultura.

Nenhum dos meios de cultura analisados apresentou influência significativa tanto para o surgimento, como para a manutenção do número de células que expressavam os marcadores analisados. Um exemplo disto é o número de células marcadas para anti-SMA, que caiu aproximadamente na mesma proporção ao longo dos dias em todos os meios analisados. No que se refere à marcação de anti-SMP, houve diferença qualitativa entre os meios. Pois apenas no meio 4, no dia 1 de cultura, havia células que expressavam este marcador. Assim, quando comparado aos outros meios, o meio 4 foi o único que apresentou um diferencial no processo de reprogramação celular.

Além de analisar isoladamente cada marcador, para as células que expressaram SMP, avaliamos também se havia dupla marcação com anti-SMA. Abaixo, exibimos o gráfico (Figura 12) com a variação no número de células anti-SMP positivas duplamente marcadas com anti-SMA (anti-SMP/anti-SMA), que nos mostra qual a porcentagem das células anti-SMP positivas (Figura 10) que também estavam marcadas para anti-SMA.

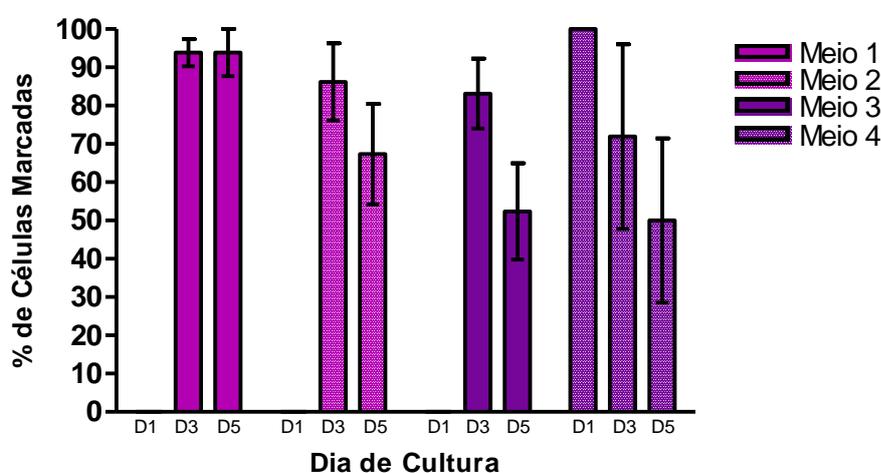


Figura 12: Porcentagem de células em cultura duplamente marcadas anti-SMP/anti-SMA.

A análise estatística quanto a variações significativas entre os meios indicou que não houve diferença entre os vários tratamentos. Em todos os meios, partiu-se de uma porcentagem alta de células duplamente marcadas, e esta dupla marcação foi sendo perdida ao longo dos dias.

4.3.2. Influência dos meios sobre a morfologia celular

A morfologia observada em todas as células foi semelhante àquela da célula muscular lisa (análise feita por visualização das células em cultura, dados não mostrados), independentemente do meio utilizado.

4.4. Efeito do Tempo de Cultura

Como não houve diferença significativa entre os meios utilizados, unimos os resultados dos quatro meios analisados (para cada “n”: somamos os resultados dos quatro meios e dividimos por quatro, esta média foi utilizada como dado para os gráficos a seguir), levando em consideração, portanto, apenas o fator tempo.

4.4.1. Efeito do tempo de cultura sobre o número de células marcadas

Podemos verificar na Figura 13 que o efeito do tempo de cultura foi diferente sobre o número de células que tiveram marcação positiva para anti-SMA, anti-HNK-1, anti-SMP e anti-B-TUBIII.

A porcentagem de células anti-SMA positivas foi reduzindo gradativamente com o tempo de cultura. No dia 1 este marcador foi expresso em aproximadamente 90% das células em cultura, no dia 3 em cerca de 85% destas, enquanto que no dia 5 este número caiu para aproximadamente 55% das células analisadas.

A marcação para anti-HNK-1 no dia 1 foi exibida por aproximadamente 30% das células em cultura, no entanto, sofreu uma queda no dia 3 para aproximadamente 15%, aumentando um pouco no dia 5, onde em torno de 25% das células apresentavam marcação para anti-HNK-1.

Já a marcação para anti-SMP apareceu no dia 1 em aproximadamente 7% das células em cultura, aumentou no dia 3 para aproximadamente 45% destas e sofreu uma leve queda no dia 5, no qual em torno de 40% das células encontravam-se marcadas para anti-SMP.

Por fim, no dia 1 não houve células marcadas para anti-B-TUBIII, sugerindo que para a expressão deste marcador, há a necessidade de mais tempo de cultura. A marcação começou a ser visualizada no dia 3, no qual aproximadamente 20% das células em cultura eram anti-B-TUBIII positivas, sendo que no dia 5 este número aumentou para cerca de 45%.

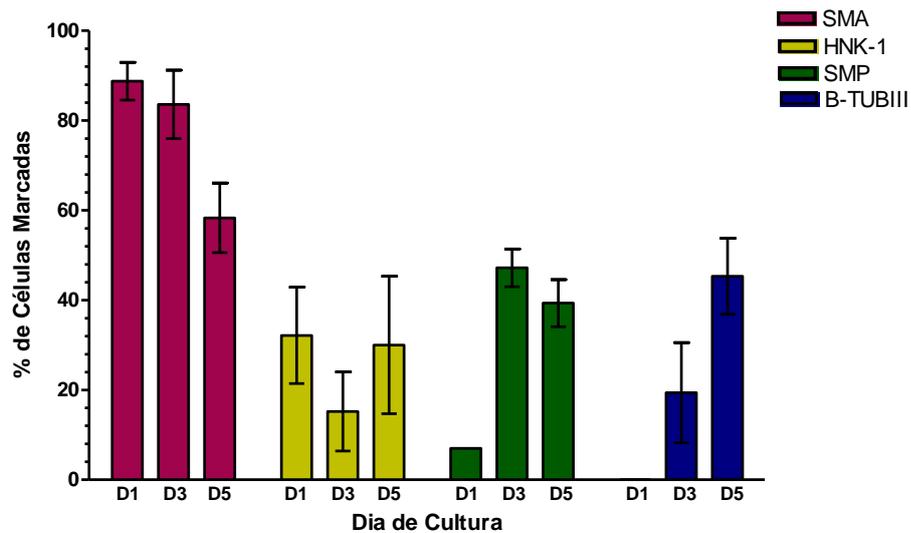


Figura 13: Porcentagem de células marcadas para anti-SMA, anti-SMP, anti-B-TUBIII e anti-HNK-1 de acordo com o tempo de cultura.

Com a Figura 14, ilustramos o aspecto da cultura celular no dias 1, 3 e 5. Os resultados foram agrupados de maneira a mostrar em cada dia analisado, quais os fenótipos celulares presentes e qual sua porcentagem em relação ao número total de células da cultura.

No dia 1 células anti-SMA positivas foram predominantes na cultura, com considerável presença de células anti-HNK-1 positiva e baixa presença de anti-SMP positivas. No dia 3 as anti-SMA e anti- HNK-1 positivas diminuíram em número, enquanto aumentou o de anti-SMP positivas e surgiram as células anti-B-TUBIII positivas. Por fim, no dia 5, a porcentagem de células positivas para anti-SMA caiu um pouco mais, o de anti-SMP também decresceu, e houve aumento no número de células marcadas para anti-HNK-1 e anti-B-TUBIII.

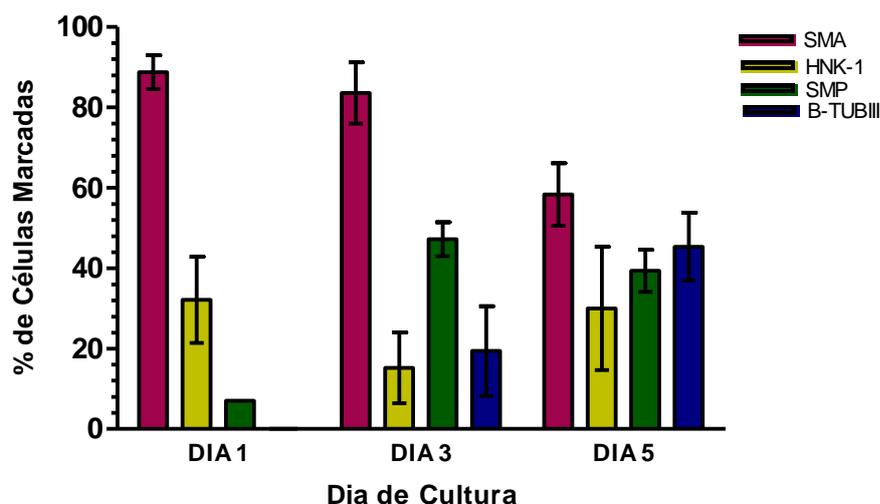


Figura 14: Caracterização da cultura muscular lisa com um, três e cinco dias. De acordo com a porcentagem de células marcadas para anti-SMA, anti-SMP, anti-B-TUBIII e anti-HNK-1, cuja variação se deu com a mudança dos dias de cultura.

Com relação à dupla marcação anti-SMP/anti-SMA, apresentamos as médias dos dias 3 e 5 de cultura. No dia 3, cerca de 85% das células anti-SMP positivas também estavam marcadas para anti-SMA e no dia 5, em média 45% das células anti-SMP positivas estavam duplamente marcadas com anti-SMA. Estes dados não foram exibidos em gráficos, para facilitar a visualização destes.

4.4.2. Efeito do tempo de cultura sobre a morfologia celular

A morfologia observada em todas as células foi semelhante àquela da célula muscular lisa (análise feita por visualização das células em cultura, dados não mostrados), independentemente do dia de cultura em que foram fixadas as células.

5. Discussão

5.1. Estabelecimento da Cultura Celular

Relatamos nos resultados, no tópico referente ao estabelecimento da cultura, que esta havia sido desenvolvida com sucesso. Demonstramos isto através de imagens de células em cultura (Figura 5), com morfologia típica de células musculares lisas. No entanto, quando apresentamos o gráfico que mostra a variação do número de células anti-SMA positivas, de acordo com o meio de cultivo e tempo de cultura (Figura 8), chamamos a atenção para o fato de que nem todas as células, no dia 1, eram marcadas para anti-SMA, o que poderia sugerir que nossa cultura celular não é pura, havendo contaminação por outras células. No entanto, observamos já nesse primeiro dia de cultura a presença de células positivas para anti-SMP (Figura 10). Além disto, observamos que virtualmente todas as células que expressavam SMP também expressavam SMA, sugerindo um processo de reprogramação celular.

Observamos também no dia 1 alterações no nível de expressão de SMA, com parte das células expressando fortemente este marcador, e parte destas apresentando uma marcação mais fraca. Este resultado pode sugerir uma progressiva perda na expressão de SMA nas células em cultura já no dia 1 (Figura 15). Assim, estes dois resultados, dupla marcação anti-SMP/anti-SMA e níveis variáveis na expressão de SMA, indicam-nos que no dia 1 de cultura nossas células já têm identidade alterada, com isto, concluímos que nem todas as células no dia 1 dia são marcadas para anti-SMA não devido a uma contaminação celular da cultura, e sim, devido a um processo de reprogramação celular.

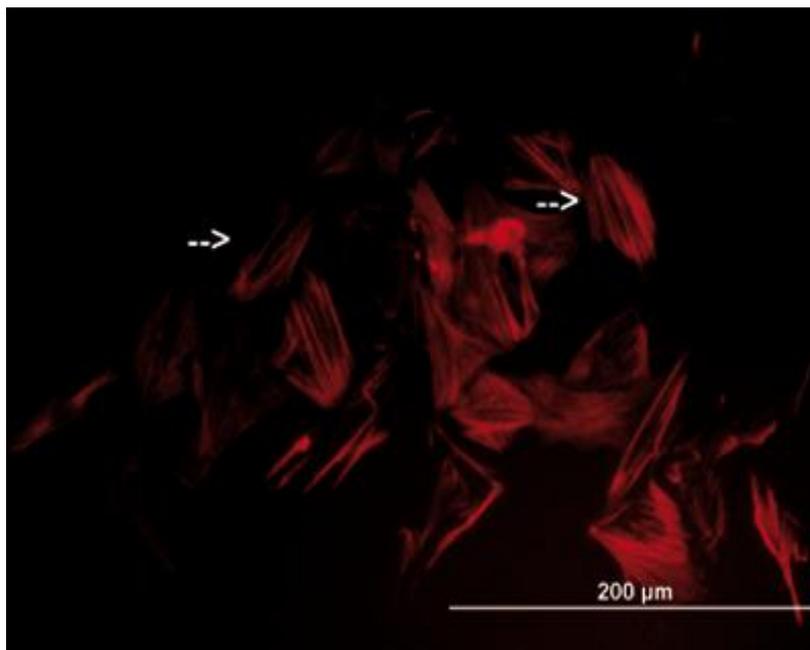


Figura 15: Diferentes intensidades de marcação para anti-SMA. Imagem de células marcadas para anti-SMA, com setas em branco indicando, à esquerda, uma célula marcada com menor intensidade e outra, à direita, indicando uma célula com marcação mais definida do que aquela. Aumento de 200 vezes.

5.2. Reprogramação Celular

A perda na expressão do marcador celular de músculo liso (anti-SMA) e expressão de marcadores típicos de outros fenótipos (anti-HNK-1, anti-SMP e anti-B-TUBIII), sugere o fenômeno de reprogramação celular. Surge então a pergunta: qual(is) processo(s) de reprogramação celular pode(m) estar ocorrendo?

A diminuição no número de células marcadas para anti-SMA poderia sugerir processo de desdiferenciação, o qual é caracterizado por “uma perda das características específicas do tipo celular ao qual pertencia a célula”. Ora, se considerarmos que: a expressão de SMA é uma característica que define células musculares lisas e que no dia 1 de cultura há uma perda na expressão de SMA, podemos sugerir que houve uma reprogramação celular por desdiferenciação celular em nossa cultura de células musculares lisas. No entanto, como SMA é expresso também em algumas células epiteliais (Mahelková *et al.*, 2009), por exemplo, torna-se desejável mais algum indício para afirmarmos com maior certeza que houve desdiferenciação celular em nossa cultura de células.

Assim, avaliamos a expressão de HNK-1, expresso por células indiferenciadas da CN, através do marcador anti-HNK-1, para o qual foram observadas células positivas já com um dia de cultura. Portanto, no dia 1 de cultura,

temos uma perda na expressão de SMA e a expressão de um marcador de célula indiferenciada (anti-HNK-1), o que corrobora nossa hipótese de desdiferenciação celular. Ainda, a expressão de HNK-1 pelas células no dia 1 é fraca e aleatória (Figura 16A), apresentando-se mais intensa no dia 5 de cultura (Figura 16B), o que seria esperado se as células estivessem começando a desdiferenciar (dia 1), progredindo nesse processo ao longo dos dias, ao final dos quais (dia 5), a expressão de HNK-1 já é mais marcante.

Contudo, a expressão de HNK-1 não é encontrada exclusivamente em células indiferenciadas da CN, pois o epítipo HNK-1 está presente em várias moléculas envolvidas na adesão entre células, adesão ao substrato e em interações de matriz extracelular (Luider *et al.*, 1992). Desse modo, a utilização de outros marcadores fenotípicos mostra-se necessária, para que caracterizemos com maior segurança as alterações fenotípicas exibidas pelas células em cultura.

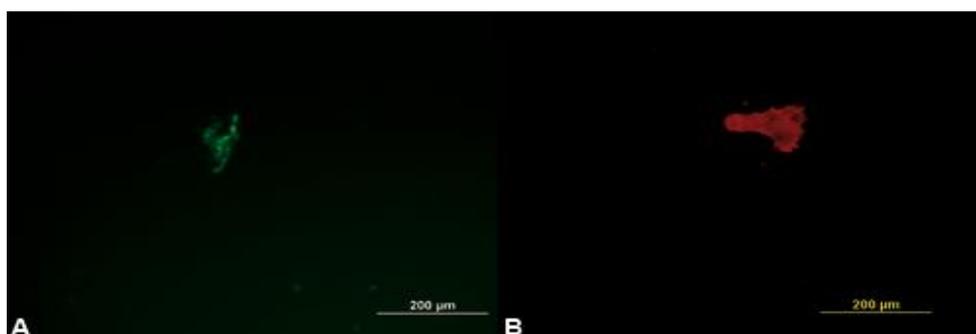


Figura 16: Diferenças na expressão de HNK-1 nos dias 1 (A) e 3 (B) de cultura. Aumento de 200 vezes.

Já o processo de transdiferenciação celular é caracterizado por “uma mudança direta - sem passar por um estágio desdiferenciado - de uma célula diferenciada a um fenótipo diferente”. Real e colaboradores (2005) demonstraram a transdiferenciação de células de Schwann (anti-SMP positivas) em células musculares lisas (anti-SMA positivas). Neste estudo (Real *et al.*, 2005), no dia 3 de cultura surgiram células fracamente marcadas para anti-SMA, das quais a maioria expressava também SMP. Já no dia 7 de cultura, a maioria das células anti-SMA positivas deste estudo expressava somente este marcador, além de fazê-lo mais intensamente do que no dia 3 e de apresentar morfologia de célula muscular lisa. Em nosso trabalho, observamos no dia 1 de cultura, células duplamente marcadas para anti-SMP/anti-SMA, com redução da proporção de duplas marcações no dia 3 (Figura 12) e no dia 5. Isto nos sugere, assim como no trabalho mencionado, um

processo de transdiferenciação celular. No entanto, diferentemente do relatado por Real e colaboradores, em nossos experimentos nenhuma alteração morfológica foi encontrada.

É importante ressaltar que neste trabalho, células marcadas para anti-B-TUBIII estão presentes nas culturas, ao contrário dos trabalhos descritos até o momento sobre reprogramação celular em células de origem na CN (Dupin *et al.*, 2003; Real *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2006). No entanto, apesar de o marcador anti-B-TUBIII ser amplamente aceito como marcador de células neuronais, também é encontrada esta marcação em células de tumor epitelial e em células mesenquimais indiferenciadas (Jouhilahiti *et al.*, 2008). Assim, torna-se interessante uma análise com outros marcadores neuronais, para fortalecer nossos resultados.

Contudo, com o intuito de já agregarmos mais um indício de que está havendo uma derivação de células comprometidas com o fenótipo neuronal, a partir de células musculares lisas, relatamos um resultado preliminar de uma cultura fixada no dia 15, onde havia células positivas para anti-B-TUBIII, com morfologia semelhante à neuronal (Figura 17). Em conjunto, nossos resultados sugerem que as células musculares lisas de aorta em cultura podem sofrer processo de desdiferenciação e/ou transdiferenciação para outros fenótipos derivados da CN.

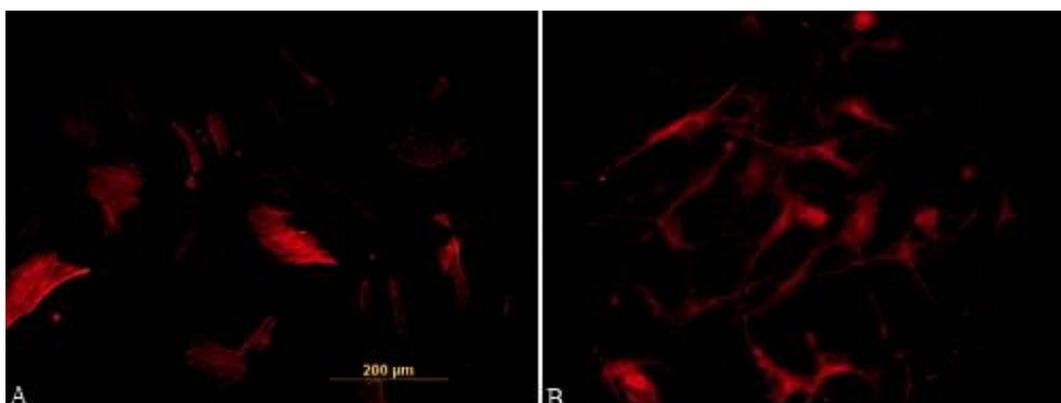


Figura 17: Comparação da morfologia e marcação celulares de células anti-SMA positivas (A) e células anti-B-TUBIII positivas (B). Notar os prolongamentos existentes em A (15 dias de cultura), enquanto em B (1 dia de cultura) as células apresentam morfologia mais fusiforme e retangular.

5.3. Efeito do meio de cultura e do tempo de cultivo na reprogramação celular

Surgiu então a pergunta: qual o principal fator responsável pela reprogramação celular em nosso modelo de estudo? Para respondê-la, avaliamos o efeito dos meios de cultura e do tempo de cultivo.

Começamos esta discussão analisando a influência do meio 1, chamado “meio basal”. Este meio foi utilizado tendo em vista que nos trabalhos publicados de Dupin *et al.*, 2000; Dupin *et al.*, 2003; Real *et al.*, 2005 e Real *et al.*, 2006, o processo de reprogramação celular ocorreu mesmo no meio destituído de fatores definidos. Foi tendo em vista a composição deste meio (sem fatores definidos) que determinamos e utilizamos nosso meio basal.

Conforme o esperado, no meio basal e em todos os meios derivados deste, observamos reprogramação celular em nosso modelo de estudo. Isto nos indica que, também aqui, a exemplo do que ocorreu nos estudos supracitados, os fatores definidos são prescindíveis para a ocorrência de reprogramação celular. Analisaremos cada meio com fatores determinados a seguir.

No meio 2 utilizamos uma suplementação com insulina, uma vez que alguns trabalhos científicos relacionam este hormônio com a diferenciação neuronal (Fischer *et al.*, 2002; Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2008). No entanto, não observamos diferenças significativas em relação aos outros meios de cultura utilizados, quanto à expressão de B-TUBIII.

O meio 3, α -MEM completo, é utilizado em culturas de células da CN embrionária, por promover a diferenciação para a maioria dos fenótipos derivados desta (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2007), sendo por isto utilizado no presente estudo. Observamos, de fato, a expressão de todos os fenótipos analisados, porém sem diferenças significativas em relação aos meios 1, 2 e 4.

Por fim, o meio 4, α -MEM completo com insulina, foi utilizado por ser baseado no meio 3, por poder propiciar uma ampla gama de fenótipos derivados da CN, no entanto com uma dose extra de insulina (10.000 vezes maior que no meio 3 e igual a do meio 2), também, como no meio 2, para tentarmos uma indução para o fenótipo neuronal. Em nossos resultados não vimos um diferencial deste meio para a expressão de B-TUBIII pelas células, no entanto, ele nos trouxe um resultado inesperado, pois este meio foi o único no qual, com um dia de cultura, houve a expressão de células SMP positivas.

Ao consultarmos a literatura, verificamos que a insulina é descrita como agente mitogênico para células de músculo liso (Fadini *et al.*, 2007). Além disto, foi relatado que o comprometimento de cascatas de transdução de insulina está

envolvido com a formação de tumores que contêm células gliais, como os gliomas (Becker *et al.*, 2006). Com base nisto, poderíamos sugerir um possível efeito da insulina no processo de reprogramação, ao aumentar a proliferação celular de músculo liso e ao induzir alguns destes a expressão de SMP, característico de células gliais de Schwann.

Quanto ao tempo de cultura, esperávamos que, quanto maior fosse este, maiores seriam também as modificações celulares apresentadas. Já que, no trabalho já citado de Real e colaboradores (2005), com o desenrolar da cultura houve uma expressão cada vez mais intensa de SMA, sendo acompanhada de modificação em nível morfológico.

O que observamos em nosso trabalho foi que, com o aumento do tempo de cultura, de fato houve um número maior de células positivas para cada marcador, já que células positivas para anti-B-TUBIII só apareceram no dia 3 e células anti-HNK-1 positivas tiveram esta marcação intensificada ao longo dos dias de cultura. Assim, percebemos que com um tempo maior de cultura, a população celular se apresenta mais heterogênea, sugerindo intensificação do processo de reprogramação celular.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as células musculares lisas de aorta, com origem na CN, podem sofrer reprogramação celular *in vitro*, tanto por desdiferenciação, como por transdiferenciação celular. A reprogramação ocorreu em todos os meios utilizados, independentemente dos fatores diferenciais que estes contivessem. Dentre estes, no entanto, a presença de insulina em um dos meios foi um aspecto diferencial para a expressão de SMP por células em cultura no dia 1. Com o tempo de cultura, a população celular se tornou mais heterogênea. Por fim, destacamos a obtenção de células anti-B-TUBIII positivas a partir das células musculares lisas, o que até o momento não foi descrito a partir de nenhum outro derivado da CN, sendo resultado inédito na literatura.

Referências

ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A.; RUEGER, M.A.; MKHIKIAN, H.; KORB, E.; MCKAY, R.D. Signaling pathways controlling neural stem cells slow progressive brain disease. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2008

BAKER C.V. The evolution and elaboration of vertebrate neural crest cells. Current Opinion in Genetics & Development, v. 18, n. 6, p. 536-543, 2008.

BECKER, A.J.; BLIIMCKE, I.; URBACH, H.; HANS, V.; MAJORES, M. Molecular neuropathology of epilepsy-associated glioneuronal malformations. Journal of Neurophatology and Experimental Biology, v. 65, n. 2, p. 99-108, 2006.

BLELLOCH, R. Shortcut to cell replacement. Nature, 455, p. 604-605, 2008.

CALLONI, G. W.; PARDANAUD, C.G.; DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 50, p. 19879-19884, 2007.

CHEN, E.H.; Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. Science, p. 369-373, 2005.

CHUNG, Y.; BISHOP, C.E.; TREFF, N.R.; WALKER, S.J.; SANDLER, V.M.; BECKER, S.; KLIMANSKAYA, I.; WUN, W.; DUNN, R.; HALL, R.M.; SU, J.; LU, S.; MASERATI, M.; CHOI, Y.; SCOTT, R.; ATALA, A.; DITTMAN, R.; LANZA, R. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. Cloning and Stem Cells, v. 11, n. 2, p. 213-223, 2009.

COSTA-SILVA B.; DA COSTA M.C.; MELO F.R.; NEVES C.M.; ALVAREZ-SILVA M.; CALLONI G.W.; TRENTIN A.G. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. Experimental Cell Research, v. 315, n. 6, p. 955-967, 2009.

DO, J.T.; SCHÖLER, H.R.; Regulatory circuits underlying pluripotency and reprogramming. Trends in Pharmacological Sciences, v. 30, n. 6, p. 296-302, 2009.

DUPIN, E.; GLAVIEUX, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N.M. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 14, 7882-7887, 2000.

DUPIN, E.; REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N.M. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: Transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. Developmental Biology, v. 100, n. 9, p. 5229-5233, 2003.

DUPIN E.; REAL C., LE DOUARIN, N.M. The neural cresta stem cells: control of neural cresta cell fate and plasticity by endothelin-3. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 73, n. 4, 2001.

EBERHARD, D.; TOSH, D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, p. 33-40, 2008.

EGLI, D.; EGGAN, K. Nuclear transfer into mouse oocytes. *Journal of Visualized Experiments*, p. 1-3, 2006.

FADINI, G.P.; PAULETTO, P.; AVOGARO, A.; RATTAZZI, M. The good and the bad in the link between insulin resistance and vascular calcification. *Atherosclerosis Journal*, v. 193, n. 2, p. 241-244, 2007.

FISCHER., A.J.; DIERKS, B.D.; REH, T.A. Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development*, v. 129, n. 9, p. 2283-2291, 2002.

GOVINDAN, J.A.; GREENSTEIN, D. Embryogenesis: anchors away! *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 890-892, 2007.

GURDON, J.B.; MELTON, D.A. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, v. 322, n. 5909, p. 1811-1815, 2008.

HADJANTONAKIS, A.K.; PAPAIOANNOU, V.E. Can mammalian cloning combined with embryonic stem cell technologies be used to treat human diseases? *Genome Biology*, v. 3, n. 8, p. 1-6, 2002.

JAENISCH R.; YOUNG R. Stem Cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 567-582, 2008.

JOUHILAHTI, S.; PELTONEN, J. Class III β -tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 56, n. 12, p. 1113-1119, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, L. *Histologia Básica*. 8.ed., 2005.

KATSETOS, C.D.; DRÁBEROVÁ, E.; SMEJKALOVÁ, B.; REDDY, G.; BERTRAND, D.; DE CHADARÉVIAN, J.P.; NISSANOV, J.; BAAS, P.W.; DRÁBER, P. Class III β -tubulin and γ -tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells. *Neurochemical Research*, v. 32, n. 8, p. 1387-1398, 2007.

KRULL, C.E. Segmental organization of neural crest migration. *Mechanisms of Development*, v. 105, p. 37-45, 2001.

KUMAR, M.S.; OWENS, G.K. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Journal of The American Heart Association*, v. 23, p. 737-747, 2003.

LE DOUARIN, N.M. Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Development, Growth & Differentiation*, p. 11-28, 2008.

LE DOUARIN, N.M.; CREUZET, S.; COULV, G.; DUPIN, E. Neural crest plasticity and its limits. *Development*, v. 131, p. 4637-4650, 2004.

LEROU, P.H.; DALEY, G.Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews*, v. 19, p. 321-331, 2005.

LI, Z.; SUN, X.; CHENA, J.; LIUA, X.; WISELYC, S.M.; ZHOUD, O.; RENARDD, J.; LENOA, G.H.; ENGELHARDTA, J.F. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Developmental Biology*, p. 439-448, 2006.

LUIDER, T.M., PETERS-VAN DER SANDEN, M.J.; MOLENAAR, J.C.; TIBBOEL, D.; VAN DER KANUP, A.W.; MEIJERS, C. Characterization of HNK-1 antigens Turing the formation of the avian enteric nervous system. *Development*, v. 115, n. 2, p. 561-572, 1992.

MAHELKOVÁ, G.; BACÁKOVÁ, L.; KORYNTA, J.; VAJNER, L.; VYTÁSEK, R. Effect of culture substrate and culture conditions on lens epithelial cell proliferation and alpha-smooth muscle actin expression. *Folia Biologica*, v. 55, n. 2, p. 66-76, 2009.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E. Clonally cultured differentiated pigmento cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potencial. *Developmental Biology*, v. 300, n. 2, p. 656-669, 2006.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. *International Journal of Developmental Biology*, v. 49, p. 151-159, 2005.

RZUCIDLO, E.M.; MARTIN, K.A.; POWELL, R.J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery*, v. 45, n. 6, p. 25-32, 2007.

SHARMA, R.K.; NETLAND, P.A. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Research*, v. 1176, p. 11-17, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

THOWFEEQU, S.; MYATT, E.J.; TOSH, D. Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Developmental Dynamics*, p. 3208-3217, 2007.

TRENTIN, A.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 4495-500, 2004.

WELSTEAD, G.G.; SCHORDERET, P.; BOYER, L.A. The reprogramming language of pluripotency. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 18, n. 2, p. 123-129, 2008.

WESTERN P. Foetal germ cells: striking the balance between pluripotency and differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 53, p. 393-409, 2009.

WOLPERT, L.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYERO E. *Princípios de biologia do desenvolvimento*. 3.ed., 2008.

YAMANAKA, S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, v. 363, n. 1500, p. 2079-2087, 2008.

YU, J.; VOFYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G.A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, v. 318, p. 1917-1920, 2007.

YUN, D.H.; SONG, H.Y.; LEE, M.J.; KIM, M.R.; KIM, M.Y.; LEE, J.S.; KIM, J.H. Thromboxane A₂ modulates migration, proliferation, and differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 41, n. 1, p. 17-24, 2009.