

Diego Amarante da Silva

"AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS TIPO 2 (FGF2) NA MIGRAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE CODORNAS (*COTURNIX COTURNIX JAPÔNICA*)"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Orientadora: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis
2017

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

Silva, Diego Amarante da

Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares do fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2 (FGF2) na migração, proliferação e diferenciação das células da crista neural truncal de codornas (*Coturnix coturnix* japônesa) / Diego Amarante da Silva ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin, coorientador, Ricardo Castilho Garcez, 2017.

98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Crista Neural. 3. Melanócitos. 4. Fator de Crescimento de Fibroblasto do Tipo 2 - FGF2. 5. Progenitores Mesenquimais. I. Trentin, Andréa Gonçalves. II. Garcez, Ricardo Castilho. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

"Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares do fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) na migração, proliferação e diferenciação das células da crista neural truncal de codornas (*Coturnix coturnix japonica*)"

Por

Diego Amarante da Silva

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (06/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Gelson de Souza Izídio

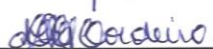
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento


Banca examinadora:




Dr(a) Andréa Gonçalves Tretin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Cláudia Beatriz Nedel M. de Aguiar (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Talita da Silva Jeremias (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) José Marques de Brito Neto (Universidade Federal do Rio de Janeiro)


Dr.(a) Denise Avani Bittencourt (Secretaria de Estado da Saúde - SC)

Florianópolis, 26 de maio de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin por ter aceitado a minha participação no laboratório e a tarefa de me orientar. Agradeço pelos ensinamentos durante todos esses anos e por me incentivar a sempre buscar progredir e fazer melhor

Ao meu coorientador Dr. Ricardo Castilho Garcez, obrigado pela paciência para me ouvir e ajudar a encontrar as melhores soluções para os problemas que apareceram no percurso. Obrigado também por ter me apoiado, lá em 2012, a elaborar a proposta de doutorado à Profa. Andréa.

À minha orientadora no exterior Dra Elisabeth Dupin, muito obrigado pelo apoio e pela oportunidade de trabalhar num instituto de renome internacional e manter contato com grandes pesquisadores. Foi um ano de grandes ganhos nas áreas profissional e pessoal.

Aos meus pais, Mauro Matos da Silva e Derci Amarante da Silva e demais familiares, pela fé depositada em mim e por acreditarem na minha capacidade, muitas vezes desacreditada por mim mesmo. Obrigado por todas as orações, pedidos, pensamentos e depósitos bancários a mim dedicados.

Às grandes amigas e colaboradoras deste trabalho, Dra Bianca Teixeira e Dra Silvia Beatriz Visoni, minha eterna gratidão pelos conselhos, pelas discussões, sugestões e pelos experimentos que contribuíram tanto para o desenvolvimento deste trabalho quanto para meu crescimento como pessoa.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelos ensinamentos e apoio à minha formação.

A todos os colegas/amigos integrantes e ex-integrantes do LACERT, os quais não mencionarei nomes, porém todos vocês sabem da sua participação no desenvolvimento deste trabalho, seja através de uma conversa amiga, de um ombro ouvinte, de uma cerveja, ou até mesmo “colocando a mão na massa”, vocês são a minha segunda família, sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui.

A todos os meus amigos adquiridos em Paris, aqui em Florianópolis e aos já antigos que, perto ou longe, sempre me deram força e foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida e festejarem

os momentos de alegria ou estenderem a mão para me ajudar quando eu precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e também às agências financiadoras FAPESC, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), INTT, e PRONEX/CNPq.

“The only interesting thing about vertebrates is the neural crest”
Thorogood, 1989.

RESUMO

A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória, comum a todos os vertebrados, que se origina da parte dorsal do tubo neural e coloniza o embrião em desenvolvimento, dando origem a diversas estruturas como células gliais, neurônios e os melanócitos da pele. As células da CN diferenciam em resposta a uma complexa rede de sinalização presente no microambiente, incluindo a sinalização de FGF2 e fatores de transcrição como *Sox10*, *FoxD3* e *Mitf*. O FGF2, um fator mitogênico envolvido nos processos da CN desde a sua indução até a diferenciação final, pode representar uma importante ferramenta no tratamento de neurocristopatias. Neste trabalho, foi demonstrado em culturas secundárias de células da CN da região truncal (CNT) de embriões de aves, que o FGF2 aumenta a população de células da CN através do aumento da proliferação e, principalmente, através do aumento da sobrevida das células em culturas secundárias. Contudo, o tratamento com FGF2 não alterou o halo de migração e proliferação celular durante a fase de migração em culturas primárias. As células da CNT tratadas com FGF2 e estimuladas à diferenciação apresentaram maior sobrevida dos progenitores com capacidade de diferenciação em melanócitos. Pode-se propor assim, que o FGF2 aumenta a sobrevida dos progenitores de melanócitos através da modulação da expressão dos fatores de transcrição *Sox10*, *FoxD3* e *Mitf*. Além disso, o FGF2 não alterou a potencialidade das células da CNT, porém, estimulou a propagação de progenitores mesenquimais da CNT, fenótipos estes que são gerados *in vivo* apenas pelas células da CN da região cefálica (CNC), através de várias passagens sem que houvesse prejuízo aos fenótipos neurais. Ademais, as culturas tratadas com FGF2 apresentaram vários gânglios neuronais e maior capacidade de diferenciação em células gliais por até 5 passagens. Este trabalho acrescenta informações para o avanço na compreensão do processo de diferenciação das células da CN embrionária e é importante para o aperfeiçoamento tecnológico na busca de prevenir ou restaurar danos causados por enfermidades relacionadas às células da CN, como melanoma e vitiligo.

Palavras-chave: Crista neural truncal, melanócitos, sobrevida celular, fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2, *Sox10*, *FoxD3*, *Mitf*, progenitores mesenquimais

ABSTRACT

Neural crest (NC) is an embryonic and transitory structure of vertebrates; it arises at the dorsal region of neural tube and colonizes the developing embryo giving rise to various cell phenotypes such as glial cells, neurons and the melanocytes from the skin. NC cells differentiate in response to a complex signaling network present in microenvironment, including FGF2 signaling and transcription factors such as *Sox10*, *FoxD3* and *Mitf*. FGF2, a mitogenic factor involved in NC processes from induction to the complete cell differentiation, could represent an important tool in treatment of neurocristopathies. In this work, it was demonstrated in NC cell cultures of the trunk region (TNC) from avian embryos, that FGF2 increases cell population through the increase in cell proliferation and specially through increasing cell survival in secondary cultures. Nevertheless, FGF2 treatment did not alter cell migration and proliferation during the migration phase in primary cultures. TNC cells treated with FGF2 and stimulated to differentiation showed increased survival of progenitors endowed with melanocytic phenotype. We suggest FGF2 increases the melanocyte progenitors by modulating the expression of the transcription factors *Sox10*, *FoxD3* and *Mitf*. Furthermore, FGF2 did not modify the potentiality of TNC cells, but, it did stimulate the propagation of TNC mesenchymal progenitors, through several passages without losing the neural phenotypes. The mesenchymal phenotypes are generated *in vivo* by NC from cephalic region (CNC) and not by TNC. In addition, the treated cultures showed several neurons ganglia and increased differentiation in glial cells up to 5 passages. This work adds information to move forward the understanding of the differentiation process of embryonic NC cells and it is important for chasing advanced technologies to avoid or restore injuries caused by NC related illness, ass melanoma and vitiligo.

Key words: trunk neural crest, melanocyte, cell survival, fibroblast growth factor 2, *Mitf*, *Sox10*, *FoxD3*, mesenchymal progenitors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Indução da CN durante o processo de neurulação.	30
Figura 2 – Árvore hierárquica dos progenitores da CNT de codornas..	35
Figura 3 – Organograma do desenho experimental.....	41
Figura 4 – Representação do desenho experimental de cultivo e diferenciação mesenquimal das células da CNT	44
Figura 5 – Análise da migração das células da CNT a partir do tubo neural e proliferação celular durante a fase de migração	54
Figura 6 – Expressão de HNK1 nas células da CNT na fase de migração	55
Figura 7 – Crescimento celular durante o tratamento com FGF2 em cultura secundária.....	56
Figura 8 – Crescimento celular após tratamento com FGF2 em diferentes intervalos de tempo.....	58
Figura 9 – Efeito de FGF2 na proliferação e sobrevivência das células da CNT durante a fase de diferenciação celular.....	59
Figura 10 – Efeito de FGF2 na expressão de HNK1 e Sox10 durante a fase de diferenciação celular	61
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2 %	62
Figura 12 – Efeito de FGF2 na expressão de Mitf e FoxD3 durante a fase de diferenciação das células da CNT	64
Figura 13 – Efeito de FGF2 na expressão de SMP em culturas de células da CNT	66
Figura 14 – Efeito de FGF2 da diferenciação melanocítica das células da CNT.....	67
Figura 15 – Efeito de FGF2 na propagação das células da CNT	68
Figura 16 – Diferenciação de células da CNT (R1) para fenótipos neurais e mesenquimais.....	70
Figura 17 – Imunofluorescência de células da CNT marcadas para tirosina hidroxilase (TH) e β -tubulina III (TuJ1) em R1	71
Figura 18 – Diferenciação de células da CNT (R2-R5) para fenótipos neurais e mesenquimais.....	73
Figura 19 – Clones de células da CNT sobre monocamada de células 3T3 e induzidas à diferenciação para fenótipos neurais e mesenquimais após tratamento com FGF2 [10 ng/mL].....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Níveis de marcação de células da CNT em R1.	69
Quadro 2 – Níveis de marcação de células da CNT em R2-R5	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados para reações de imunofluorescência.	47
Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-qPCR.....	50
Tabela 3 – Porcentagem de clones de células da CNT.....	74

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Equação de Pfaffl.	51
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de Variância
BMP	Proteína Morfognica de Osso
BrdU	Bromodeoxiuridina
B-tubulina III	Tubulina β -III
cDNA	DNA complementar
CN	Crista Neural
CNC	Crista Neural Cefálica
CNT	Crista Neural Truncal
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato de Embrião
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FoxD3	<i>Forkhead box D3</i>
HNK1	<i>Natural Killer</i> Humano 1
LACERT	Laboratório de Células-Tronco e Regenerao Tecidual
MDF	Fatores de diferenciao mesenquimal
Mitf	Fator de transcrio associado  microftalmia
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reao em cadeia da polimerase
PF	Paraformaldeído
RNAm	RNA mensageiro
RT	Transcriptase reversa
RT-qPCR	Reao da Transcriptase Reversa seguida pela Reao em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SBF	Soro Bovino Fetal
SMA	Actina de Músculo Liso
SMP	Proteína de mielina de célula de Schwann
Sox10	SRY (<i>Sex Determining Region Y</i>)-Box 10
T3	3-3'-5 triiodo-L-thironina
Trp1	Proteína Relacionada à Tirosinase-1
TH	Tirosina hidroxilase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Célsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Por cento
cm^2	Centímetro quadrado
cT	<i>Cycle Threshold</i>
g	Gramma
h	Horas
M	Molar
mg	Miligramma
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
N	Normal
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pM	Picomolar
pH	Concentração hidrogeniônica do meio
U	Unidades
v/v	Volume por volume
X	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 CRISTA NEURAL	29
1.1.1 Indução e transição epitélio-mesenquimal das células da CN	30
1.1.2 Migração e diferenciação das células da CN	32
1.1.3 Potencialidade das células da CN	34
1.2 FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO TIPO 2 (FGF2).....	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 METODOLOGIA	41
3.1 ANIMAIS.....	41
3.2 CULTURAS DE CÉLULAS.....	42
3.1.1 Cultura primária de células da CNT de codornas	42
3.1.2 Cultura secundária	42
3.1.3 Passagens seriadas	43
3.1.4 Clonagem celular	43
3.3 ANÁLISE DA ÁREA DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	44
3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	45
3.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR	45
3.5.1 Meio complexo	45
3.5.2 Meio de diferenciação mesenquimal	46
3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	46
3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES POR HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	48

3.8 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	48
3.8.1 Síntese de cDNA	49
3.8.2 PCR em tempo real	49
3.8.3 Eletroforese em gel de agarose	51
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS	53
4.1 EFEITO DO FGF2 NA FASE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.....	53
4.1.1 FGF2 não influencia a migração e nem a proliferação das células da CNT durante a fase migratória	53
4.1.2 FGF2 reduz a expressão de HNK1 nas células da CNT durante a fase migratória	54
4.2 EFEITO DO FGF2 NA FASE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.....	55
4.2.1 FGF2 estimula a proliferação e a sobrevivência das células da CNT durante a fase de diferenciação celular	57
4.2.2 FGF2 estimula a proliferação de células da CNT positivas para HNK1 durante a fase de diferenciação.....	59
4.2.3 Padronização dos oligonucleotídeos iniciadores para experimentos de RT-qPCR.....	60
4.2.4 FGF2 reduz a expressão gênica de Sox10 em células da CNT durante a fase de diferenciação celular.....	62
4.2.5 FGF2 reduz a expressão de Mitf em células da CNT durante a fase de diferenciação celular	62
4.2.6 FGF2 reduz a expressão de <i>FoxD3</i> em células da CNT durante a fase de diferenciação celular.....	63
4.2.7 FGF2 influencia a diferenciação das células da CNT para os fenótipos glial e melanocítico	65
4.3 EFEITO DO FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT EM FENÓTIPOS MESENQUIMIAIS.....	68
4.3.1 FGF2 influencia a propagação das células da CNT	69

4.3.2 FGF2 influencia a diferenciação e propagação dos progenitores mesenquimais da CNT.....	69
4.3.3 Influência de FGF2 na multipotencialidade de progenitores mesenquimais e neurais das células da CNT	74
4.4 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	76
5 DISCUSSÃO	77
5.1 FGF2 NA FASE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.. ...	77
5.2 FGF2 NA FASE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.....	78
5.3 FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DE FENÓTIPOS MESENQUIMAIS.....	84
6 CONCLUSÕES	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRISTA NEURAL

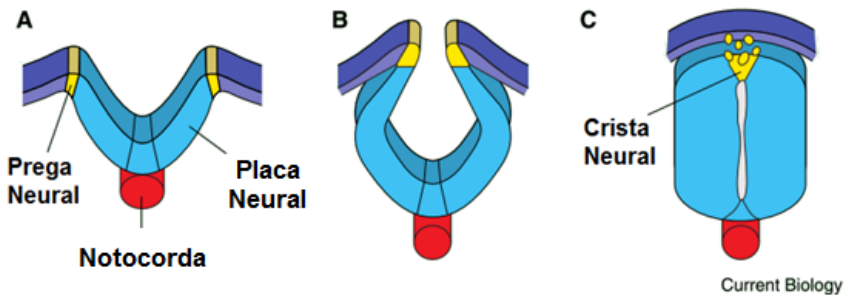
A mesoderme, característica dos animais triblásticos, é distinguida como um folheto embrionário devido à enorme diversidade de células e tecidos a que ela origina. Além disso, a mesoderme origina os mesmos tipos celulares e órgãos em todos os animais triblásticos. No entanto, a crista neural (CN), originada a partir da ectoderme, dá origem a um número ainda mais diverso de estruturas quando comparada àquelas que a mesoderme origina. Ainda, as estruturas originadas pela CN também são evolutivamente conservadas nos vertebrados. Tanto a mesoderme quanto a crista neural dão origem ao mesênquima embrionário e, considerando-se diversos pontos, se a mesoderme é qualificada como um folheto embrionário, a CN também deveria ser (HALL, 2000).

A transição evolutiva para os vertebrados se deu em associação com uma forma de predação mais ativa, alcançada graças ao surgimento de uma mandíbula articulada derivada das células da CN. Desta forma, o grande diferencial dos vertebrados em relação aos outros cordados ocorre na cabeça, onde a CN dá origem a derivados mesenquimais, formando os tecidos conjuntivo, esquelético e muscular. No tronco, a formação dos derivados mesenquimais é exclusiva da mesoderme (GANS; NORTH CUTT, 1983; GREEN; SIMOES-COSTA; BRONNER, 2015). A CN, um grupo de células transitórias que emerge da parte dorsal do tubo neural durante o desenvolvimento dos vertebrados, fascina os cientistas que estudam o desenvolvimento devido à sua multipotencialidade, capacidade de migração ao longo de todo o embrião e de gerar um número extraordinário de fenótipos celulares diferenciados (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; MUÑOZ; TRAINOR, 2015). Além disso, os estudos envolvendo as células da CN ganham atenção devido ao vasto número de doenças relacionadas, conhecidas como neurocristopatias. Entre elas encontram-se o albinismo, a doença de Hirschsprung (megacólon congênito), o neuroblastoma, neurofibromas, neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 e 3, entre tantas outras (NOISA; RAIVIO, 2014).

A CN é uma população de células embrionárias, descrita pela primeira vez em 1868 pelo embriologista suíço Wilhelm His em embriões de galinha. O surgimento da CN ocorre cedo no desenvolvimento dos vertebrados, durante a neurulação, quando as

placas neurais se dobram uma em direção à outra para formar o tubo neural. Durante esse processo, as bordas da placa neural, que fazem fronteira com a ectoderme não neural (também chamada de ectoderme epidermal), formam as pregas neurais. Com a separação do tubo neural da ectoderme adjacente, ocorre a transição epitélio-mesenquimal das células dispostas ao longo do lado dorsolateral do tubo neural, formando assim a CN (Figura 1). A indução da CN é dependente da interação entre a ectoderme não neural, as pregas neurais e a mesoderme posicionada abaixo da ectoderme (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; GRAHAM, 2003; LEDOUARIN; CALLONI; DUPIN, 2008).

Figura 1 – Indução da CN durante o processo de neurulação. A placa neural se dobra e progressivamente forma o tubo neural (azul claro). A linha média ventral da placa neural se aproxima da notocorda (vermelho) (A). As pregas neurais (amarelo) se formam na interface entre a placa neural e a ectoderme epidermal (azul escuro) (B). As pregas neurais se juntam progressivamente para formar o aspecto dorsal do tubo neural e a CN (amarelo) (C).



Fonte: Adaptado de GRAHAM (2003).

1.1.1 Indução e transição epitélio-mesenquimal das células da CN

Uma série de morfógenos influenciam o surgimento e a especificação das células da CN, como as proteínas morfogenéticas de osso (BMPs), membros das famílias Wingles (Wnt) e do fator de crescimento de fibroblasto (FGF). A BMP e o Wnt são produzidos pelas pregas neurais e pela ectoderme não neural, enquanto Wnt e FGF são derivados da mesoderme. Participam também deste processo as vias de sinalização Notch/Delta, Hedgehog, endotelina, entre outros (HUANG; SAINT-JEANNET, 2004; STUHLMILLER; GARCÍA-CASTRO, 2012).

Em um primeiro momento, FGF auxilia na indução das células da CN diretamente ou indiretamente através da sinalização de Wnt. Neste estágio, BMP é inibida por FGF. Em um segundo momento, FGF é inibido e, assim, permite a ativação de BMP que forma uma via de sinalização juntamente com Wnt (PRASAD; SAUKA-SPENGLER; LABONNE, 2012; STUHMILLER; GARCÍA-CASTRO, 2012). Como resultado, um conjunto de fatores de transcrição que especificam as pregas neurais é formado. Entre eles estão *Msx1/2*, *Pax3/7*, *Zic1*, *Id3* e *Ap2*. Um segundo grupo de fatores de transcrição, chamados de especificadores da CN é então produzido. Encontram-se neste grupo *Snail1/2*, *Sox9/10*, *Ap2*, *Twist* e *Foxd3*. A expressão destes fatores faz com que as células das pregas neurais deixem de expressar marcadores ectodermais e do tubo neural e passem a expressar fatores necessários para a migração celular. Os especificadores da CN continuam a auxiliar na manutenção e controle da CN desde a transição epitélio-mesenquimal até a migração e diferenciação (HARRIS; ERICKSON, 2007; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008; STEVENTON; MAYOR, 2012). Estes especificadores ativam a transcrição de genes efetores da CN que, por sua vez, permitem que as células adquiram propriedades migratórias, além de algumas propriedades de diferenciação. Dentre estes efetores encontram-se alguns fatores de transcrição, como, por exemplo, *Mitf* (na linhagem melanocítica que forma as células pigmentadas); algumas pequenas proteínas G, como GTPases, por exemplo, que permitem às células mudarem sua morfologia e migrarem; além de receptores de superfície celular, como os receptores tirosina cinases *Ret* e *Kit*, que permitem às células da CN a responderem aos sinais presentes no ambiente (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; GILBERT; BARRESI, 2016).

Após sua formação, as células da CN sofrem delaminação e transição epitélio-mesenquimal através de alterações na adesão e arquitetura celulares. A delaminação é definida pela divisão de um tecido em populações separadas, enquanto a transição epitélio-mesenquimal consiste em uma série de eventos moleculares que trazem modificações de um fenótipo epitelial para um mesenquimal. O principal evento na delaminação das células da CN é a diminuição das moléculas de adesão, como as caderinas, o que promove a separação das células do epitélio e permite o início da migração celular (KALCHEIM, 2015; MUÑOZ; TRAINOR, 2015).

1.1.2 Migração e diferenciação das células da CN

Após a transição epitélio-mesenquimal, as células da CN migram por rotas específicas para diversos sítios no embrião onde se diferenciam em múltiplos tipos celulares, como neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, melanócitos, células da medula adrenal e, na região cefálica, dão origem aos osteócitos, condrócitos, células do tecido conjuntivo e de músculo liso (BRONNER-FRASER; FRASER, 1989; FRANK; SANES, 1991; GRAHAM, 2003; TRENTIN et al., 2004; CALLONI et al., 2009).

Durante a migração, as células da CN são expostas a um grande número de reguladores positivos e negativos que controlam seu destino, modulando sua mobilidade e direção. Além disso, como as células da CN migram em grupos, interações célula-célula possuem um papel crucial na polarização das células e na interpretação dos sinais externos. A cooperação entre células pode gerar uma polaridade geral à população, direcionando a migração celular coletiva (KURIYAMA; MAYOR, 2008; THEVENEAU; MAYOR, 2011; BRONNER, 2012).

Ao longo do eixo anteroposterior, a CN pode ser subdividida em quatro regiões anatômicas (sobrepostas) principais. Estas são as regiões cefálica, cardíaca, truncal e vagal/sacral, que migram através de diferentes rotas, dando origem a células e tecidos característicos (TRAINOR, 2005), conforme descrito abaixo:

- As células da CN cefálica (CNC) migram para produzir o mesênquima craniofacial. As células desta região se diferenciam em cartilagem, osso, neurônios craniais, células gliais e tecidos da face. Além de entrarem nos arcos faríngeos para dar origem às células do timo, odontoblastos e os ossos da orelha média e mandíbula (GRAHAM; BEGBIE; MCGONNELL, 2004; BRONNER; LEDOUARIN, 2012).
- A crista neural cardíaca é uma região da CNC e se estende desde os placóides óticos até os terceiros somitos. Estas células dão origem a melanócitos, neurônios, cartilagens e tecido conjuntivo. As células provindas desta região também são responsáveis por produzir a parede do tecido conjuntivo muscular das grandes artérias, além de contribuírem com o septo que separa a circulação pulmonar da aorta (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; DUPIN; CREUZET; LE DOUARIN, 2006).

- As células da CN vagal e sacral dão origem aos gânglios parassimpáticos do intestino (GRAHAM, 2003). A crista neural vagal (pescoço) se sobrepõe à CNC e a CN truncal (CNT), correspondendo à região dos somitos 1-7 (em aves), enquanto a CN sacral corresponde à região posterior ao somito 28. Defeitos na migração destas regiões acarretam na ausência de movimentos peristálticos nos intestinos (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).
- As células da CNT dão origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, assim como a células pigmentares da pele. Elas possuem duas rotas de migração distintas ao longo do embrião: a primeira, dorsoventral, dá origem a neurônios sensoriais e simpáticos e células gliais. Na segunda rota, a dorsolateral, as células se instalam entre a derme e a epiderme, dando origem aos melanócitos da pele (LE DOAURIN; KALCHEIM, 1999; BAREMBAUM; BRONNER-FRASER, 2005). A região alvo do presente estudo é a CNT.

As células da CNC e as células da CNT diferem quanto ao repertório de fenótipos celulares a que cada região dá origem. As células da CNC possuem a capacidade de dar origem a osso e cartilagem, por outro lado, as células da CNT não são capazes de gerar estes fenótipos *in vivo* (LWIGALE, 2004). A incapacidade das células da CNT em gerar osso e cartilagem está ligada à expressão de genes Hox. Se os genes Hox são expressos nas células da CNC, estas falham em formar tecidos ósseos e cartilagem (CREUZET et al., 2002). Esta habilidade de formar tecidos ósseos deve ter sido uma propriedade primitiva das células da CN e de fundamental importância na formação da armadura óssea observada em várias espécies de peixes já extintas (GRAHAM; BEGBIE; MCGONNELL, 2004; LE DOUARIN; DUPIN, 2012). A habilidade de gerar tecidos ósseos ainda permanece latente nas células da CNT, uma vez que, cultivando estas células em meio contendo uma série de hormônios e fatores, a potencialidade em gerar fenótipos mesenquimais é revelada (GRAHAM; BEGBIE; MCGONNELL, 2004; ITO; ITO, 2006; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013).

A contribuição da CN na geração de tecidos pode ser direta, provendo células; ou indireta, provendo um ambiente indutivo, através do qual outras células se desenvolvem (LE DOAURIN; KALCHEIM, 1999; HALL, 2009). As células da CN possuem uma ampla capacidade de diferenciação, por se tratar de uma população celular heterogênea. No início da migração, a CN é composta por populações de células

altamente multipotentes (com capacidade de autorrenovação e de se diferenciar em múltiplos derivados, apresentando, portanto características de células-tronco), por células progenitoras (cujo potencial de diferenciação é mais limitado) e por populações de células já comprometidas com uma linhagem celular específica (TRENTIN et al., 2004; CRANE; TRAINOR, 2006; CALLONI et al., 2009)

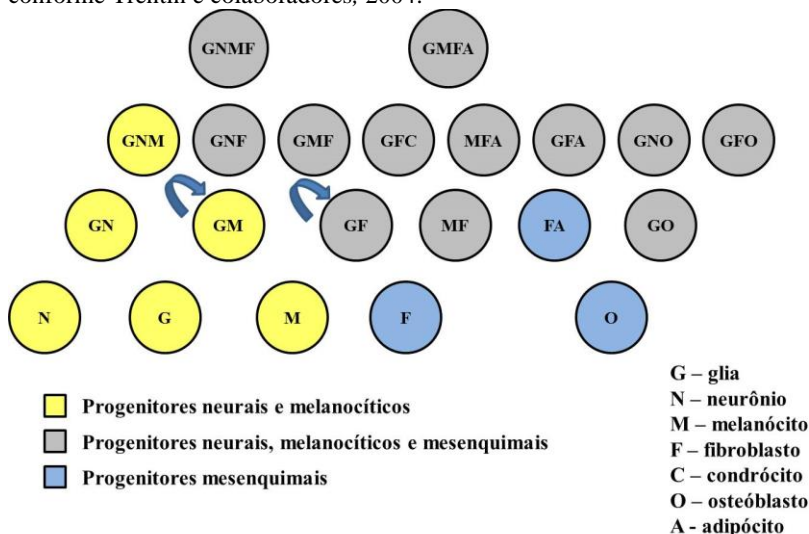
1.1.3 Potencialidade das células da CN

O processo de clonagem, descrito por Cohen e Konigsberg (1975), é o método utilizado atualmente para estudar a multipotencialidade dos progenitores da CN *in vitro*. Este método consiste em semear uma única célula e, em seguida, analisar os fenótipos encontrados na população derivada desta única célula. Desta forma, pode-se concluir que uma determinada população de células da CN possui progenitores multipotentes, bipotentes e assim por diante, definindo a potencialidade da célula fundadora da colônia.

A análise de colônias em ensaios clonais permitiu a construção de modelos hierárquicos dos progenitores da CNC e CNT. A CNC possui o progenitor no topo da hierarquia dos progenitores da CN já identificado *in vitro*, denominado GNMFCO (G-glia, N-neurônio, M-melanócito, F-fibroblasto, C-condrócito e O-osteócito) que possui potencial de diferenciação em fenótipos mesectodermiais, neuronais, gliais e pigmentares (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Já na CNT, os progenitores identificados no topo da hierarquia são o GNMF (G-glia, N-neurônio, M-melanócito e F-fibroblasto) e o GMFA (G-glia, M-melanócito, F-fibroblasto e A-adipócito) (Figura 2). Estes modelos revelam a capacidade das células da CNT em formar derivados mesenquimais *in vitro* (TRENTIN et al., 2004; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013).

O processo de diferenciação das células da CN é dependente de alguns fatores, como a região de onde emergem, as rotas migratórias adotadas ao longo do embrião e o local onde permanecerão. Os sinais do microambiente em que as células da CN se encontram durante e após a sua migração são cruciais na diferenciação destas células (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; DUPIN et al., 2010). A matriz extracelular (MEC) influencia diversos aspectos da morfogênese da CN, como a migração, a proliferação e diferenciação celular (COSTA-SILVA et al., 2009).

Figura 2 – Árvore hierárquica dos progenitores da CNT de codornas. Os progenitores identificados na CNT de codornas através de experimentos de culturas clonais possuem sua classificação baseada na potencialidade. Alguns progenitores apresentam a capacidade de autorrenovação (setas azuis), conforme Trentin e colaboradores, 2004.



Fonte: Adaptado de Coelho-Aguiar e colaboradores (2013) e Trentin e colaboradores (2004).

Fatores solúveis exercem papel fundamental na determinação do destino celular e autorrenovação dos progenitores da CN. Dentre eles estão os membros da família Wnt e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) na diferenciação de melanócitos (DORSKY; MOON; RAIBLE, 1998; GARCEZ et al., 2009), fator de crescimento de nervo (NGF), FGF e BMP na diferenciação de linhagens neuronais (REISSMANN et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1999; FÖRANDER et al., 2001; GARCEZ et al., 2009), neuregulina-1 (NRG1), ligantes de *Notch* e FGF2 na diferenciação de células gliais (SHAH et al., 1994; GARCEZ et al., 2009), fator de crescimento transformante beta (TGFB) na diferenciação de músculo liso (LI et al., 2007) e Sonic Hedgehog (Shh) na diferenciação de condrócitos (BRITO et al., 2006; CALLONI et al., 2007).

1.2 FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO TIPO 2 (FGF2)

A família dos FGFs em vertebrados é composta por 22 genes que sintetizam polipeptídios que se ligam a receptores transmembranares tirosina cinase, chamados de receptores de FGF (FGFR). Os FGFR são sintetizados por quatro genes e o seu reconhecimento é realizado através do auxílio de componentes da matriz extracelular, em especial proteoglicanos de sulfato de heparina (LEFEVRE et al., 2009). Após a ligação, o receptor se dimeriza ativando uma ou mais cascatas de sinalização intracelulares (THISSE; THISSE, 2005). Os FGFs estão relacionados a diversos estádios do desenvolvimento inicial, incluindo a formação da endoderme e mesoderme, movimentos da gastrulação, eixo antero-posterior e dorso-ventral, indução neural entre outros (BÖTTCHER; NIEHRS, 2005; DOREY; AMAYA, 2010; STUHLMILLER; GARCÍA-CASTRO, 2012).

O vasto número de funções biológicas dos FGFs e a variedade de vias de sinalização ativadas por essa família implica que a sua sinalização deve ser regulada em relação ao tempo, duração e intensidade (THISSE; THISSE, 2005). A sinalização de FGF pode ser regulada por diferentes níveis dentro da célula e no espaço extracelular. Estudos têm identificado um número crescente de proteínas com atividade de regulação específica. Estas proteínas podem ser coexpressas com FGFs, além de serem reguladas por esse fator e/ou o inibirem através de picos de *feedbacks* negativos (FÜRTHAUER et al., 2002; TSANG; DAWID, 2004).

A via de sinalização de FGF controla múltiplos aspectos do desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo a sobrevivência de progenitores neurais, proliferação, manutenção e diferenciação (MASON, 2007). FGF2 exerce um papel tanto na neurogênese quanto na gliogênese no sistema nervoso central, além de regular a proliferação e migração das células da CN (KUBOTA; ITO, 2000; GARCEZ et al., 2009; FUJITA et al., 2011). Além disso, FGF2 é um fator importante na melanogênese durante o desenvolvimento e também no corpo adulto (VARUM; SOMMER, 2013). A diferenciação e manutenção dos progenitores de melanócitos são reguladas por fatores de transcrição como *Sox10*, *Mitf* e *FoxD3* (MORT; JACKSON; PATTON, 2015). A sinalização de FGF está também envolvida na formação de condrócitos derivados da CNT de camundongos *in vitro* (IDO; ITO, 2006).

Trabalho recente do Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT-UFSC) demonstra que FGF2 mantém

as células da CN num estado de progenitor indiferenciado e com alta capacidade de proliferação celular, ao mesmo tempo em que direciona a sua potencialidade para os fenótipos neuronal e glial, havendo necessidade de remoção do fator para a diferenciação terminal. Em adição, FGF2 promove um aumento significativo na proporção dos progenitores multipotentes da CN embrionária de codorna e está envolvido na autorrenovação de progenitores bipotentes de glia e célula de músculo liso (BITTENCOURT et al., 2013). Esses importantes resultados demonstram o papel do FGF2 na manutenção da característica de célula-tronco da CN. No entanto, os aspectos moleculares ainda precisam ser elucidados.

JUSTIFICATIVA

Os FGFs representam uma grande família de ligantes que ativam vias de transdução de sinais levando a diversas respostas biológicas, incluindo diversos processos durante o desenvolvimento. Um conjunto complexo de sinais extracelulares é necessário para especificação, migração e diferenciação das células da CN. No entanto, como estes sinais funcionam para coordenar tais eventos ainda não é bem compreendido.

O FGF2 é um importante regulador celular que possui diversas rotas de sinalização. Estudos do LACERT-UFSC já mostraram que FGF2 influencia a diferenciação e proliferação das células da CN. O estudo das alterações biológicas provocadas por FGF2 em populações derivadas da CN pode nos esclarecer algumas questões a respeito das moléculas expressas em tempo/espaco específicos durante os processos de migração, proliferação e diferenciação das células da CN, além disso, os efeitos do FGF2 na potencialidade dos progenitores mesenquimais da CNT pode ajudar a elucidar os mecanismos pelos quais esse potencial não é observado *in vivo*.

Uma melhor compreensão do desenvolvimento das células da CN é importante, devido aos inúmeros fenótipos celulares e teciduais a que estas células dão origem e devido ao potencial uso clínico em malformações congênitas e medicina regenerativa a que estes conhecimentos poderão se aplicar no futuro, principalmente no desenvolvimento de terapias utilizando morfógenos para tratamento ou como marcadores biológicos com implicações diagnósticas, prognósticas e preventivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os mecanismos celulares e moleculares relacionados aos efeitos do fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) na migração, proliferação e diferenciação das células da crista neural truncal de embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do FGF2 na migração e proliferação das células da CNT durante a fase de migração *in vitro*;
- Avaliar o papel do FGF2 na regulação molecular envolvida na proliferação, sobrevivência e diferenciação inicial da CNT durante a fase de diferenciação *in vitro*;
- Determinar os efeitos do FGF2 na diferenciação neural e melanocítica nas células da CNT;
- Analisar a influência do FGF2 na diferenciação mesenquimal das células da CNT;
- Descrever os efeitos da FGF2 na propagação das células da CNT;
- Avaliar a influência do FGF2 na potencialidade mesenquimal de progenitores da CNT.

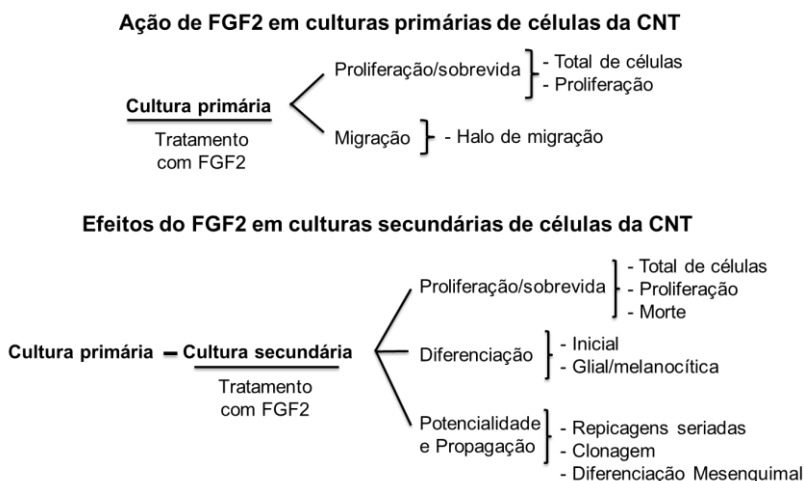
3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização das culturas de células da CN foram usados embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*). Foram utilizados ovos fecundados obtidos da Granja de Codornas DuMuty de Rio do Sul – SC e da granja *Cailles de Chanteloup* de Corps Nuds – França (para os experimentos realizados no *Institut de la Vision* de Paris – França). O protocolo de utilização animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) e a Comissão Interna de Biossegurança da UFSC (CIBio-UFSC) (PP787).

As células da CNT foram obtidas a partir de embriões nos estádios de desenvolvimento de 23 a 25 somitos. Em média foram utilizados 25-35 embriões por experimento. O período de incubação dos ovos foi de 48 h a 38°C em chocadeira com umidade relativa de 65 %. Os experimentos foram realizados conforme o organograma da Figura 3.

Figura 3 – Organograma do desenho experimental.



Fonte: do próprio autor (2017).

3.2 CULTURAS DE CÉLULAS

3.1.1 Cultura primária de células da CNT de codornas

Os tubos neurais foram isolados da região truncal de embriões de codorna de 23 a 25 somitos, dissecados em solução de pancreatina (6,25 g/L, Sigma) com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio e colocados em placas de cultura de 35 mm (Corning). Os tubos neurais foram mantidos por 18 ou 24 h em meio de cultura composto por α -MEM (Gibco) ou DMEM (Gibco), contendo 10 % de Soro Bovino Fetal (SBF, Cultilab), 2 % (v/v) de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 μ g/mL, Gibco) em estufa úmida a 37°C, com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. Em alguns experimentos, FGF2 (Sigma) foi acrescentado ao meio na concentração de 10 ng/mL. Em seguida, as células da CNT foram submetidas às análises ou a culturas secundárias.

3.1.2 Cultura secundária

Após o período de migração de 18 h em cultura primária descrito acima, os explantes do tubo neural foram removidos e descartados. As células remanescentes, que correspondem às células da CN, foram descoladas com solução de tripsina a 0,25 % (v/v) e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02 % (EDTA, v/v, Sigma), e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10 % de SBF seguido de centrifugação (500 X g por 7 min). Para as culturas de massa, as células foram ressuspensas em meio α -MEM ou DMEM e semeadas em placas de cultura de 35 mm (8,5 cm²) ou placas de cultura de 24 poços (1,9 cm², Corning) revestidas com colágeno I (5 μ g/cm², BD), na densidade de 2600 células/cm² (para os experimentos realizados no Brasil) ou de 5000 células em gotas de 10 μ l (para os experimentos realizados na França). As células foram mantidas por até 5 dias (120 h) em meio composto por α -MEM ou DMEM, contendo 10 % de SFB, 2 % de EE, penicilina e estreptomicina e acrescidos ou não de FGF2 (Sigma) na concentração de 10 ng/mL.

Após o período de cultura, as células foram fixadas e submetidas à análise de expressão de marcadores por imunofluorescência (item 3.6); submetidas à extração do RNA total para análise de expressão gênica por RT-qPCR (item 3.8); repicadas seriadamente (item 3.1.3); ou ainda submetidas a experimentos de clonagens celulares (item 3.1.4).

3.1.3 Passagens seriadas

Com o objetivo de avaliar a influência do FGF2 na expansão das culturas de células da CNT e a propagação de seus progenitores, as culturas secundárias foram repicadas seriadamente a cada 5 dias até um total de 5 passagens. Após o período de 18 h de migração em culturas primárias, foram realizadas as culturas secundárias conforme descrito acima. As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços revestidas com colágeno I, no número de 5000 células em gotas de 10 µl. Estas culturas foram chamadas de repicagem 1 (R1) e foram mantidas por 5 dias (120 h) em meio composto por DMEM, contendo 10 % de SFB, 2 % de EE, penicilina e estreptomicina e acrescidos ou não de FGF2 (Sigma) na concentração de 10 ng/mL. A cada 5 dias o procedimento foi repetido, realizando-se a contagem das células recuperadas e replaqueando-as até R5.

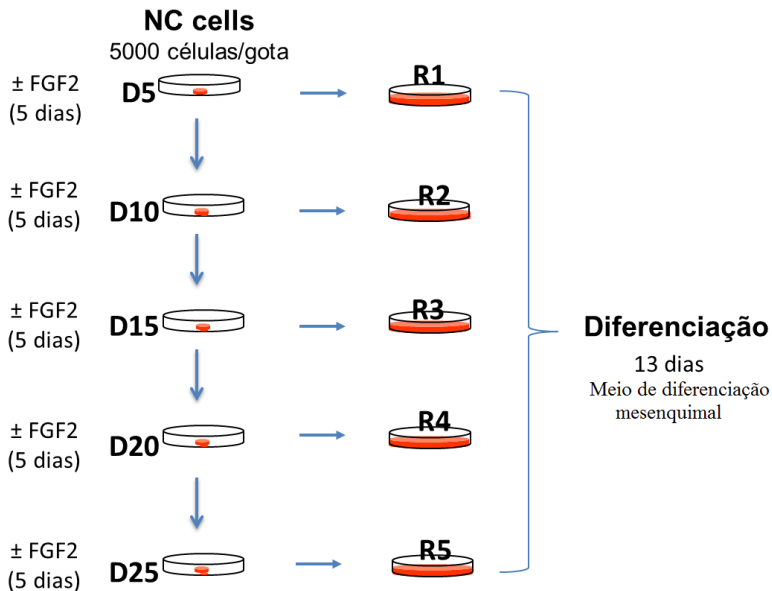
A cada repicagem, uma parte das células remanescentes foi separada e plaqueada em placas de 4 poços (1,9 cm², Corning) revestidas com colágeno I, no número de 15000 células em gotas de 15 µl. Estas culturas foram mantidas por 13 dias em meio com fatores de diferenciação mesenquimal (MDF) (item 3.5.2), em estufa úmida a 37°C, com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade (Figura 4). As trocas do meio de cultivo foram realizadas a cada 3-4 dias. Em seguida, as células foram fixadas e submetidas a imunocitoquímica e hibridização *in situ* para investigar a sua diferenciação neural e mesenquimal.

3.1.4 Clonagem celular

Após serem mantidas em culturas secundárias durante 5 dias na presença ou ausência de FGF2, as células foram descoladas novamente, como descrito anteriormente, para realização de clonagens celulares. Estes experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a influência do FGF2 na potencialidade dos progenitores das células da CNT com competência de diferenciação em fenótipos mesenquimais.

As células da CNT foram centrifugadas e plaqueadas na concentração de uma célula por poço, através da utilização de pipetas Pasteur ultrafinas e microscópio de luz, em placas de 96 poços sobre monocamadas de fibroblastos embrionários de camundongos Swiss 3T3. As células 3T3 tiveram a proliferação inibida pela adição do antibiótico mitomicina (5 µg/mL, Sigma) por 2 h a 37°C antes de serem contadas e plaqueadas nas placas de 96 poços em densidade de 24000 células/poço. Este processo foi realizado 2 dias antes do experimento de clonagem.

Figura 4 – Representação do desenho experimental de cultivo e diferenciação mesenquimal das células da CNT. As células da CNT foram mantidas em cultura primária por 18 h sem a adição de FGF2. O FGF2 foi adicionado ao meio de cultivo durante a cultura secundária por 5 dias. Após este período, parte das células foi separada para diferenciação e parte foi replaqueada na presença ou ausência de FGF2 por 5 dias adicionais. O processo se repetiu até a repicagem 5 (R5), estando estas células em contato ou não com FGF2 durante um total de 25 dias. Após o período de indução à diferenciação, as culturas foram submetidas às análises.



Fonte: do próprio autor (2017).

Os clones foram mantidos por 13 dias em meio de diferenciação mesenquimal (item 3.5.2), em estufa úmida à 37°C, com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. As trocas do meio de cultivo foram realizadas a cada 3-4 dias. Em seguida os clones foram fixados e submetidos a imunocitoquímica e hibridização *in situ*.

3.3 ANÁLISE DA ÁREA DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a área de migração das células da CNT, os explantes cultivados na presença ou ausência de FGF2 foram fixados após 24 h de cultura primária com 4 % de formaldeído durante 20 min e

lavadas três vezes com PBS. A seguir, os núcleos foram corados com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1 mg/ml; Sigma) e as placas observadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) e fotografadas com câmera (Olympus DP71). As medidas dos halos de migração das células da CNT do explante para a placa de cultura foram obtidas utilizando o *software* livre ImageJ (*National Institute of Health*, NIH, Estados Unidos).

3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi analisada pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Invitrogen). As monocamadas celulares foram incubadas pelo período de 1 h com BrdU (1:100), e a seguir fixadas com 4 % de formaldeído durante 20 min. Após três lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com PBS-Triton (0,3 %) durante 30 min. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de SBF a 5 % durante 30 min. As culturas foram então lavadas com água destilada e incubadas em 2N de ácido clorídrico à temperatura ambiente por 15 min. por 2 vezes e, em seguida, com tampão borato por 10 min. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU, conforme descrito no item 3.4. Os núcleos das células foram corados com DAPI. As placas foram observadas em microscópio epifluorescente invertido e fotografadas. As proporções da expressão do marcador específico (BrdU) foram analisadas pela porcentagem de células marcadas pelo anticorpo em relação às células totais.

3.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para avaliar o efeito do FGF2 na diferenciação final das células da CNT, após o tratamento com FGF2, o meio foi substituído pelo meio complexo ou meio contendo MDF, descritos abaixo.

3.5.1 Meio complexo

O meio complexo foi adicionado às culturas secundárias após ficarem 48 h ou 72 h na presença ou ausência de FGF2. O objetivo da utilização deste meio foi avaliar a influência do FGF2 na diferenciação das células da CN para os fenótipos glial e melanocítico, pois, segundo resultados anteriores do grupo de pesquisa do LACERT-UFSC, o FGF2 mantém as células da CNT indiferenciadas e aumenta a proporção de

progenitores pluripotentes, especialmente com potencialidade glial (BITTENCOURT et al., 2013). Além disso, durante a realização das culturas secundárias, foi observada a presença de grande número de células pigmentadas, fato que despertou interesse em analisar este fenótipo. Este meio é composto de α -MEM, 10 % de SBF, 2 % de EE, penicilina e estreptomicina, além de transferrina (0,2 mM), hidrocortisona (0,28 mM), glucagon (2,87 pM), insulina (0,175 nM), T3 (triiodotironina) (0,61 nM), EGF (16,55 pM), FGF2 (58,15 pM) (todos Sigma). As culturas foram mantidas por 48 h a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. A seguir as células foram fixadas e submetidas à identificação fenotípica.

3.5.2 Meio de diferenciação mesenquimal

O meio de diferenciação mesenquimal foi utilizado para avaliar os efeitos do FGF2 na estimulação da diferenciação das células da CN em fenótipos mesenquimais. O meio foi adicionado às culturas secundárias de células da CN após o tratamento de 5 dias (120 h) na presença ou ausência de FGF2. Este meio consistiu de DMEM, 10 % de SBF, 2 % de EE, penicilina e estreptomicina, além de dexametasona (0,05 mM), insulina (85 nM), T3 (1 nM), ácido ascórbico (25 mg/ml), β -glicerolfosfato (5 mM) e rosiglitazona (0,5 mM) (todos Sigma). As culturas foram mantidas por 13 dias a 37°C em atmosfera com 5 % CO₂ e 95 % de umidade. A seguir as células foram fixadas e submetidas à identificação fenotípica.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As culturas de células da CN foram fixadas com 4 % de formaldeído durante 20 min, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X 100 a 0,3 % durante 30 min. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de SBF a 5 % durante 30 min. Em seguida, as células foram incubadas por 12 h a 4°C com anticorpos primários especificados na Tabela 1.

As células foram, então, lavadas três vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween) (Sigma) por 5 min e, subsequentemente, incubadas por 1 h, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários (Tabela 1). As células foram novamente lavadas com PBS e os núcleos foram corados com DAPI. Nos controles negativos, não houve incubação com os anticorpos primários.

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados para reações de imunofluorescência.

Anticorpo primário	Fenótipo	Isotipo	Animal produzido	Diluição utilizada	Fabricante
Anti-BrdU	Proliferação	IgG1	Camundongo	1:100	Abcam
Anti-HNK1	Glia e CN indiferenciada	IGM	Camundongo	Sem diluição	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Sox10	CN	IgG	Coelho	1:100	Abcam
Anti-Mitf	Precursor melanocítico	IgG1	Camundongo	1:100	Abcam
Anti-SMP	Células de schwann	IgG1	Camundongo	Sem diluição	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-TH	Neurônio dopaminérgico	IgG2a	Camundongo	Sem diluição	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-TuJ1	Neurônio	IgG2a	Camundongo	1:800	BioLegend
Anti- α SMA	Músculo liso	IgG2a	Camundongo	1:800	Sigma
Anti-Runx2	Osteoblasto	IgG	Coelho	1:100	Sigma
MeleM	Melanócito	IgG1	Camundongo	1:800	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anticorpo Secundário			Animal produzido	Diluição utilizada	Fabricante
Anti-IgG1 de camundongo Alexa Fluor 488			Cabra	1:500	Invitrogen
Anti-IgM de camundongo Alexa Fluor 488			Cabra	1:500	Invitrogen
Anti-IgM de camundongo Alexa Fluor 594			Cabra	1:500	Invitrogen
Anti-IgG de coelho Alexa Fluor 594			Cabra	1:500	Invitrogen
Anti-IgG1 de camundongo Alexa Fluor 546			Cabra	1:800	Invitrogen
Anti-IgM de camundongo Alexa Fluor 546			Cabra	1:500	Invitrogen

Fonte: do próprio autor (2017).

As placas foram observadas em microscópio epifluorescente invertido e fotografadas. As proporções da expressão dos marcadores foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às

células totais. Para a identificação de adipócitos e melanócitos foram utilizadas a coloração específica de *Oil Red O* e a observação de melanina, respectivamente. No caso de alguns marcadores, a média da intensidade de fluorescência de cada campo foi quantificada utilizando-se o *software* ImageJ e dividida pelo número total de células do campo obtido através da contagem dos núcleos corados com DAPI. Os resultados obtidos foram expressos como unidades/célula (PORTELA et al., 2011).

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

As culturas secundárias destinadas às análises por hibridização *in situ* foram fixadas em formaldeído 4 % durante 2 h. Em seguida, as mesmas foram desidratadas em séries crescentes de metanol/PBS (25 %; 50 %; 75 %; 100 % de metanol - Merk) e armazenados a -20°C em metanol absoluto. Após reidratação numa série decrescente de metanol/PBS (75 %; 50 %; 25 %; PBS puro), as culturas foram incubadas em tampão de hibridização (formamida 50 % - Merck; EDTA 5 mM - Sigma; RNA de levedura 50 µg/mL - Roche; Tween20 0,2 % - Sigma; CHAPS 0,5 % - Sigma; heparina 100 µg/mL - Sigma; tampão SSC 1,3 X - Invitrogen) por 30 min à temperatura ambiente, seguido de uma pré-hibridização em mesmo tampão a 70°C por 2 h. A hibridização foi realizada durante 72 h em tampão de hibridização, acrescido de 500 ng/mL da sonda para *Runx2*, previamente preparada e marcada com digoxigenina (Dig) (*Kit Sonde* - Promega) (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Os núcleos foram corados com DAPI e as placas foram observadas em microscópio epifluorescente invertido e fotografadas.

3.8 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As culturas secundárias foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e, após o tratamento com FGF2, foi realizada a extração do RNA total para ensaios de RT-qPCR. O meio de cultura foi removido das placas e o RNA total destas amostras foi extraído utilizando o *kit Rneasy Micro* (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Ao final da reação, o RNA total foi eluído em água ultrapura livre de RNase e quantificado em espectrofotômetro

nanovue (GE). Após este processo, deu-se sequência à síntese do DNA complementar (cDNA).

3.8.1 Síntese de cDNA

A partir de 0,5 µg do RNA total, a fita de cDNA foi sintetizada através do *Kit* para transcrição reversa *SuperScript® III* (Invitrogen). Conforme especificações do fabricante, primeiramente foi realizada uma reação com o RNA, 1 µL de oligo(dT) 15 (Promega), 1 µL de DNTP (Promega) e água para completar um volume final de 13 µL. As amostras foram então incubadas por 5 min a 65°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para o gelo e incubadas por 1 min. Logo após, foram preparadas as reações com 4 µL de tampão, 1 µL de Dtt (Invitrogen), 1 unidade da enzima transcriptase reversa e água para completar o volume de 20 µL. Os reagentes foram misturados com a primeira reação e incubados por 1 h a 50°C e 15 min a 70°C.

Foram utilizados dois controles negativos para cada amostra na reação de RT, sendo um contendo todos os reagentes, exceto o RNA, para verificar se havia alguma contaminação na reação; e outro controle contendo todos os reagentes, exceto a transcriptase reversa, para verificar se havia contaminação por DNA genômico nas amostras. Após a síntese de cDNA, as amostras foram submetidas à qPCR.

3.8.2 PCR em tempo real

A técnica de qPCR teve como objetivo determinar a expressão relativa dos genes *FoxD3*, *Sox10* e *Mitf* nas culturas secundárias de células da CNT que foram tratadas com 10 ng/mL de FGF2 por 48 h e 72 h em comparação com as células não tratadas, utilizando a expressão do gene *Mrps27* como controle endógeno e normalizador da quantificação. Para realização da técnica, foram utilizados o método *SYBR® Green* e oligonucleotídeos específicos para cada reação (Tabela 2). Antes da realização das análises comparativas de expressão, foram determinadas a concentração ideal e a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores.

Para que os experimentos de qPCR sejam validados há necessidade de que a eficiência de amplificação, tanto para os genes alvo quanto para o controle endógeno, seja similar e próxima a 100 %. Para determinar a eficiência de amplificação para os iniciadores foram realizadas diluições seriadas das amostras de 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e 3,1 ng. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata,

utilizando cDNA de embriões de codorna no estágio 10 de desenvolvimento, pois neste estágio expressam todos os genes de interesse (GEISHA, 2015). Os dados foram gerados pelo *software Realplex StepOne* versão 2.1 (Applied Biosystems). Após determinada a temperatura de anelamento ideal e a eficiência de amplificação, foi dado sequência às análises por qPCR.

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado
Mrps27	Senso: GCTTGTTCTTGCTCCCACTC	103 pb
	Anti-senso: TAACCCTGACCACCCAACCTC	
FoxD3	Senso: CCACAACCTCTCGCTCAAC	113 pb
	Anti-senso: TTGTCGAACATGTCCTCAGAC	
Sox10	Senso: AACGCCTTCATGGTCTGG	132 pb
	Anti-senso: GGGACGCTTATCACTTTCATTC	
Mitf	Senso: CAAGCTCAGCGGCAGCAGGT	151 pb
	Anti-senso: CCATCGGACTGTTGGGCGCA	

Fonte: do próprio autor (2017).

Para os experimentos de qPCR foram utilizados 7,5 μ L de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific), oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada reação (Tabela 2) e água para completar um volume final de 15 μ L. Para os experimentos com *FoxD3*, *Sox10* e *Mrps27* foram utilizados 50 ng de cDNA e 0,5 μ M de cada iniciador, já no caso do *Mitf* foram utilizados 50 ng de cDNA e 0,3 μ M de cada iniciador (as concentrações ideais de cada oligonucleotídeo iniciador foram testadas com 0,3 μ M e 0,5 μ M).

As amostras foram desnaturadas inicialmente a 95°C por 10 min, em seguida, foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Ao fim de cada reação foi realizada a curva de dissociação (*melting curve*) na qual cada amostra foi mantida a 95°C por 15 segundos, e aquecida de 60°C a 95°C gradativamente por 20 min. Como controle negativo de reação foram utilizados todos os reagentes, exceto o cDNA.

As análises por qPCR foram conduzidas em triplicata para cada amostra, utilizando o termociclador STEPONE™ (Applied Biosystems). Os níveis de expressão foram quantificados comparativamente conforme a equação de Pfaffl (Equação 1), utilizando a expressão de *Mrps27* como normalizador da reação.

Equação 1 - Equação de Pfaffl.

$$\text{Taxa} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta\text{Ct alvo}(\text{controle} - \text{tratado})}}{E_{\text{referência}}^{\Delta\text{Ct referência}(\text{controle} - \text{tratado})}}$$

- E_{alvo} = eficiência de amplificação do gene alvo
- $\Delta\text{Ct alvo}$ = a diferença entre o Ct do gene alvo no grupo controle e no grupo tratado
- $E_{\text{referência}}$ = eficiência de amplificação do gene de referência
- $\Delta\text{Ct referência}$ = a diferença entre o Ct do gene de referência do grupo controle e no grupo tratado

Fonte: do próprio autor (2017) a partir de Pfaffl (2001).

3.8.3 Eletroforese em gel de agarose

Os experimentos de eletroforese em gel de agarose foram realizados como controle para verificar a especificidade dos produtos gerados pelas reações de qPCR. Para isso, 7 μL dos produtos das reações de qPCR foram misturados a 1 μL do reagente *Blue Green Load Dye I* (LGC) e a 1,1 μL *Blue Orange Dye* (Promega). Os produtos foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % (Invitrogen), em cuba para eletroforese (Locus Biotecnologia) por 20 min, a uma corrente elétrica de 250 V, utilizando tampão Sódio-Ácido Bórico (SB) composto por hidróxido de sódio (NaOH - Sigma) a 10 mM e pH ajustado com ácido bórico (H₃BO₃, Sigma) para 8,5. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o padrão de 100 bp (Invitrogen). Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador (Benchtop UV Transilluminator - UVP) e as imagens do gel foram capturadas através do sistema *Multidoc-It Digital Imaging System* (UVP).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em 3 replicatas experimentais e 3 replicatas biológicas e a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foram verificadas através do teste *t* paramétrico e não pareado, ou análise de variância (ANOVA) de duas vias, ou teste qui-quadrado. Todas as análises foram feitas através de *software* estatístico *GraphPad Prism 4*®. Em todas as medidas o α foi de 5 % bicaudal com significância estatística considerada para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO FGF2 NA FASE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT

Trabalho anterior do laboratório (BITTENCOURT et al., 2013), investigou o efeito do FGF2 na fase de diferenciação dos progenitores da CNT em culturas secundárias. Os resultados apontam para uma importante ação nos estágios precoces da diferenciação celular (BITTENCOURT et al., 2013). Para aprofundar essas análises, e como o processo de diferenciação celular das células da CN inicia assim que elas migram do tubo neural, no presente trabalho foram avaliados os efeitos do FGF2 na fase migratória, durante a cultura primária.

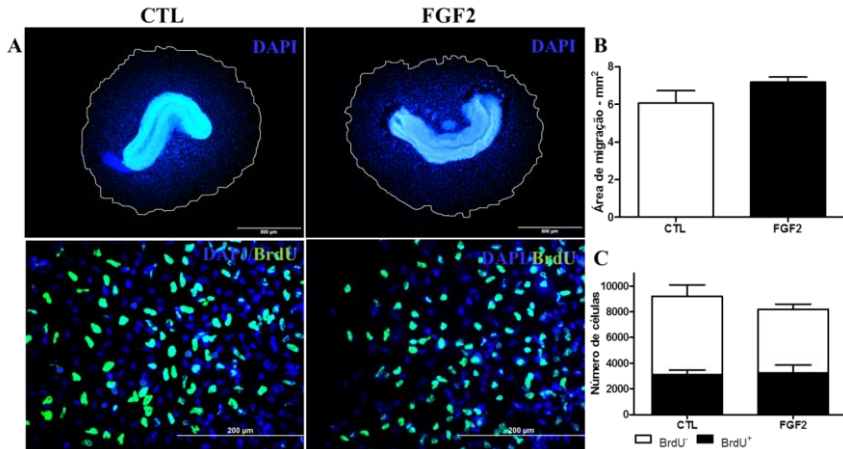
A fase de migração das células da CNT *in vitro* ocorre durante a cultura primária, quando as células migram a partir do tubo neural. As culturas primárias de células da CNT de codornas foram expostas ao FGF2 [10ng/mL] por 24 h.

4.1.1 FGF2 não influencia a migração e nem a proliferação das células da CNT durante a fase migratória

Para análise da migração celular, culturas primárias de células da CNT de codornas foram expostas ao FGF2 [10 ng/mL] por 24 h, como descrito em materiais e métodos. Culturas tratadas com o fator apresentaram halo de migração com área média de 7,18 mm², enquanto que as células mantidas nas condições controle apresentaram área de migração média de 6,05 mm². As diferenças não foram consideradas significativas (p=0,1014) (Figura 5A e B). Além disso, não foram observadas diferenças significativas no número total de células que migraram do tubo neural após quantificação dos núcleos celulares corados com DAPI (p=0,4741) (Figura 5C). O número total de células foi em média 9184 nas culturas controle e 8176 células nas culturas tratadas.

A seguir, foi analisada a proliferação celular nessas culturas por incorporação com BrdU, como descrito em materiais e métodos (Figura 5A e C). O número de células positivas para BrdU foi em média de 3128 nas culturas controle e de 3228 nas culturas tratadas com FGF2, sem diferenças significativas (p=0,3889) (Figura 5).

Figura 5 – Análise da migração das células da CNT a partir do tubo neural (A, B) e proliferação celular durante a fase de migração (C). Nas imagens, coloração azul: DAPI, demonstrando o número total de células; e coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti-BrdU, demonstrando as células em proliferação (A, segunda linha). (B) Medida da área de migração das células da CNT. (C) Quantificação das células da CNT positivas e negativas para BrdU. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado.



Fonte: do próprio autor (2017).

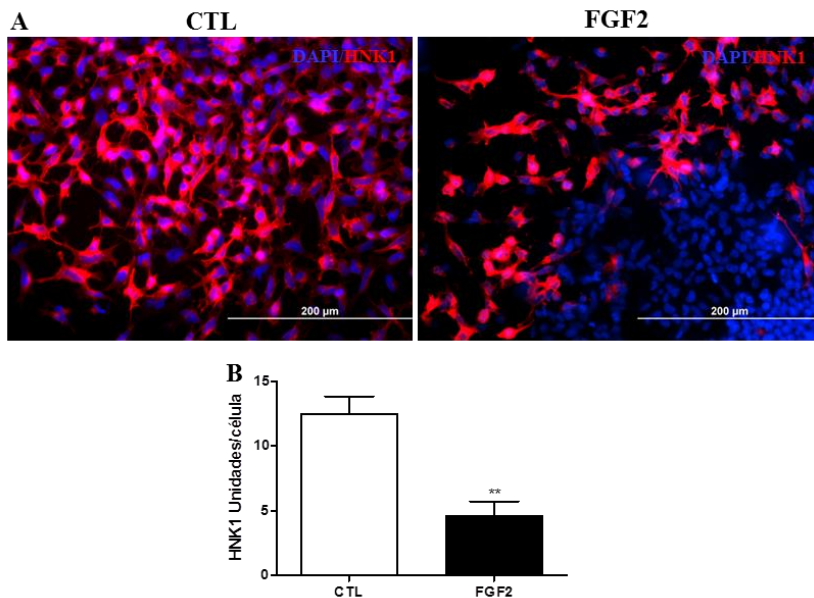
Em conjunto, esses resultados demonstram que FGF2 não influencia a migração e nem proliferação das células da CNT durante as primeiras 24 h de cultura primária, durante a fase de migração. Como consequência o número total de células não é alterado nesse período.

4.1.2 FGF2 reduz a expressão de HNK1 nas células da CNT durante a fase migratória

Foi avaliada então, a expressão de HNK1, marcador precoce de CN, nessas culturas (BRONNER-FRASER, 1986). Foi observada diminuição de 2,7 vezes na expressão desse marcador nas culturas tratadas com FGF2 em relação às culturas controle (Figura 6).

Esses resultados demonstram que apesar de FGF2 não influenciar a migração e a proliferação das células da CNT durante o período migratório, este fator reduz a expressão do marcador precoce HNK1, sugerindo um possível efeito na diferenciação celular.

Figura 6 – Expressão de HNK1 nas células da CNT na fase de migração. (A) Imunofluorescência para HNK1 em vermelho e DAPI em azul. (B) Quantificação da fluorescência de HNK1 normalizada pelos núcleos totais corados com DAPI. Os valores obtidos da intensidade de fluorescência de cada campo foram divididos pelo número de células totais sendo os resultados demonstrados como unidades/célula. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado ($p=0,0012$).

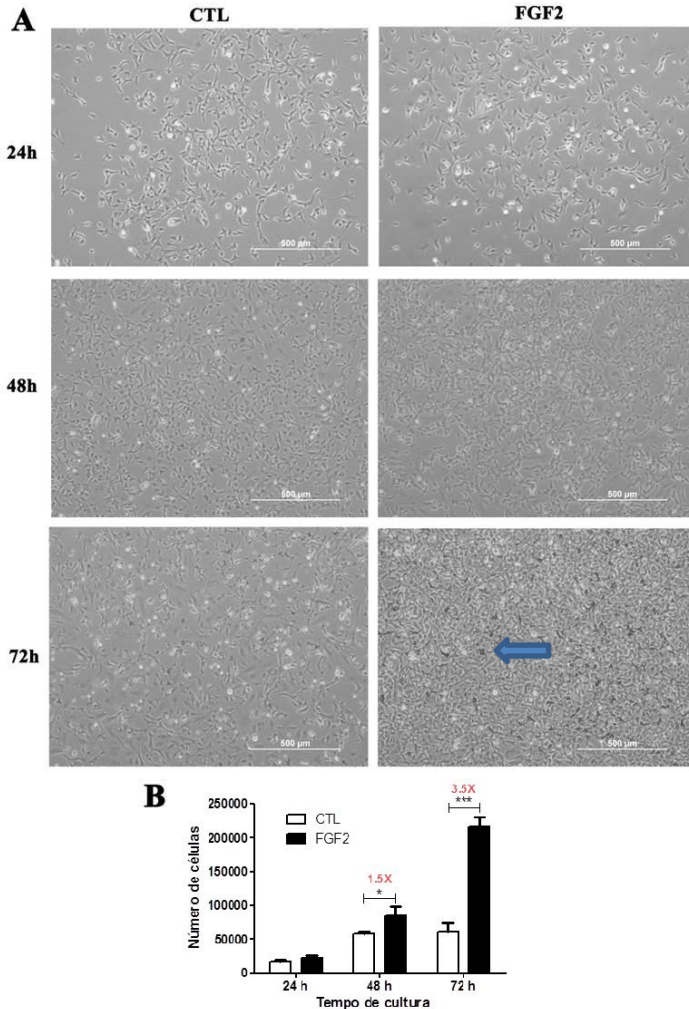


Fonte: do próprio autor (2017).

4.2 EFEITO DO FGF2 NA FASE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT

A seguir, foram avaliados os efeitos de FGF2 na fase de diferenciação das células da CNT durante as culturas secundárias, realizadas após 18 h de migração a partir do tubo neural. O tratamento com FGF2 foi realizado nas culturas secundárias por até 72 h e as células analisadas em diferentes intervalos de tempo.

Figura 7 – Crescimento celular durante o tratamento com FGF2 em cultura secundária. (A) Microscopia de contraste de fase das culturas controle e tratadas com FGF2 por 24, 48 ou 72 h. Seta azul mostrando a presença de células pigmentadas visíveis em 72 h. (B) Curva de crescimento celular pela quantificação do número de células em câmara de Neubauer após tripsinização das placas de cultura no mesmo período de tempo. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado (* $p=0,0343$; *** $p=0,0002$).



Fonte: do próprio autor (2017).

4.2.1 FGF2 estimula a proliferação e a sobrevivência das células da CNT durante a fase de diferenciação celular

Inicialmente foi analisado o crescimento das células da CNT após 24, 48 e 72 h de cultura secundária avaliando-se o número de células por contagem em câmara de Neubauer (Figura 7). Os resultados demonstram que o número de células é equivalente em ambas as condições de tratamento após 24 h de cultura secundária. No entanto, após 48 e 72 h de cultura secundária foi observado aumento de 1,5 vezes e 3,5 vezes respectivamente no número de células após o tratamento com FGF2 em relação à condição controle (Figura 7). Foi observado por microscopia de contraste de fase que FGF2 não altera a morfologia alongada e fibroblastóide das células da CNT durante esse período. Com 72 h de cultura secundária foi possível observar a presença de células pigmentadas nas culturas tratadas com FGF2, sugerindo estímulo de diferenciação para o fenótipo melanocítico (Figura 7, seta).

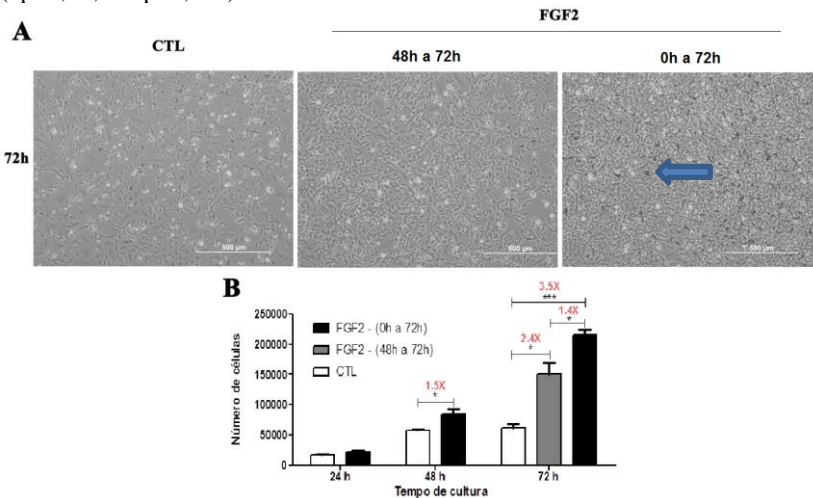
Buscando entender se esse efeito de FGF2 no crescimento celular está relacionado com o tempo de exposição do fator ou à competência das células neste estágio específico, as culturas foram expostas ao FGF2 no intervalo de tempo de 48 a 72 h. Foi possível observar que houve aumento de 2,4 vezes no número de células em relação à condição controle ($p=0,0121$) e diminuição de 1,4 vezes em relação às células tratadas por 72 h ($p=0,0352$) (Figura 8), sugerindo que o tempo de exposição ao fator influencia no crescimento celular.

A seguir, foi observado se os efeitos de FGF2 no crescimento das células da CNT durante a fase de diferenciação celular se devem ao estímulo da proliferação ou à morte celular. A proliferação celular foi avaliada nas culturas tratadas com FGF2 por 48 e 72 h por incorporação com BrdU e expressa como porcentagem em relação ao número total de células coradas com DAPI.

Os resultados demonstraram aumento de 1,2 vezes e 1,6 vezes na porcentagem de células marcadas com BrdU após 48 h. No entanto, ao comparar com o experimento anterior, foi observado que em 72 h de cultura secundária, o aumento no número total de células (3,5 vezes) é maior do que a taxa de proliferação celular (1,6 vezes). Dessa forma, questionou-se se o FGF2 poderia estar influenciando também na sobrevivência das células da CN. Para responder a esta questão, a morte celular foi quantificada pela contagem dos núcleos picnóticos, que correspondem a condensações e fragmentações da cromatina e indicam células que estão em processo de apoptose (NONES et al., 2012), e por imunomarcção para caspase-3 ativada, enzima marcadora de apoptose

(MUNDELL; LABOSKY, 2011), em 48 e 72 h de tratamento com FGF2, respectivamente (Figura 9 C e D).

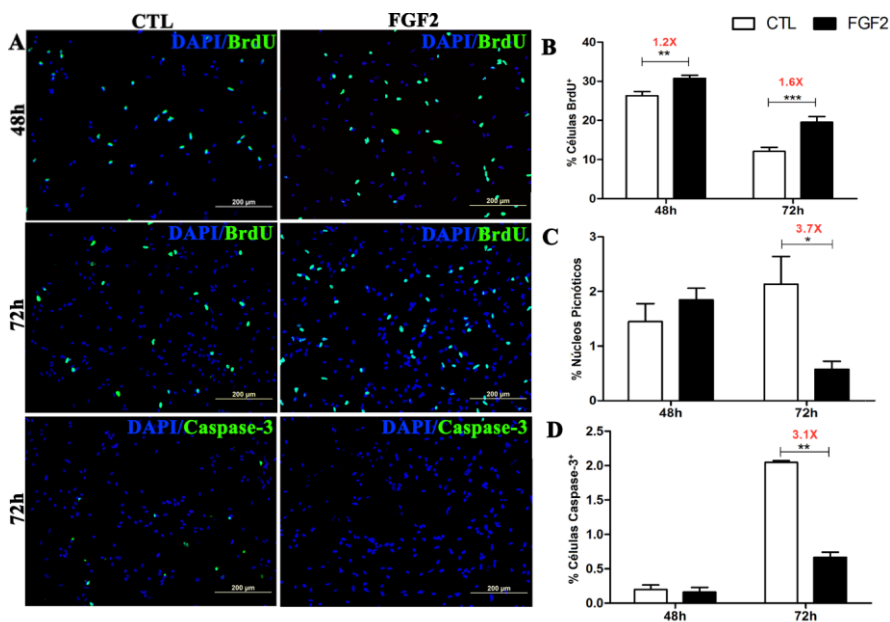
Figura 8 – Crescimento celular após tratamento com FGF2 em diferentes intervalos de tempo. (A) Microscopia de contraste de fase em 72 h de cultura secundária das células controle, tratadas com FGF2 de 48 a 72 h ou de 0 a 72 h. Seta azul mostrando a presença de células pigmentadas. (B) Quantificação das células em câmara de Neubauer após tripsinização das placas de cultura. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



Fonte: do próprio autor (2017).

Foi observado que o tratamento com FGF2 diminuiu em 3,7 vezes o número de núcleos picnóticos após 72 h de tratamento (Figura 9 C), resultado corroborado pela análise da caspase-3 ativada, que mostrou uma redução de 3,1 vezes no número de células em apoptose no mesmo período (Figura 9 D). Não foram observadas diferenças significativas após 48 h de tratamento tanto através da análise da porcentagem de núcleos picnóticos quanto na de caspase-3 ativada. Vale ressaltar que as análises de morte celular realizadas detectam apenas as células apoptóticas que permanecem aderidas às placas de cultura. Além disso, em observações em microscópio de contraste de fase foi possível perceber a presença de grande número de células mortas nos sobrenadantes nas culturas controle e não nas tratadas com FGF2 (resultados não mostrados).

Figura 9 – Efeito de FGF2 na proliferação e sobrevivência das células da CNT durante a fase de diferenciação celular. (A) Imunofluorescência para BrdU ou Caspase 3 ativada após tratamento com FGF2. Núcleos totais corados com DAPI. Porcentagem de (B) células positivas para BrdU, (C) núcleos picnóticos ou (D) células positivas para caspase-3 ativada em relação a DAPI. Resultados obtidos de 8 experimentos (no caso do BrdU e núcleos picnóticos) e 3 experimentos (no caso da caspase-3) independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Fonte: do próprio autor (2017).

Em conjunto, esses experimentos demonstram que o efeito de FGF2 no aumento do número de células da CNT durante a fase de diferenciação se deve ao estímulo da proliferação e redução da apoptose.

4.2.2 FGF2 estimula a proliferação de células da CNT positivas para HNK1 durante a fase de diferenciação

Foi analisada a seguir a influência de FGF2 nas células da CNT positivas para HNK1 durante a fase de diferenciação celular. Os

resultados demonstram que cerca de 20 % das células em ambas as condições de tratamento eram positivas para HNK1 nas culturas secundárias de 48 h. Aproximadamente 30 % destas eram também positivas para BrdU em ambas condições de cultivo. Nas culturas de 72 h, porém, o percentual de células positivas para HNK1 foi elevado para cerca de 60 % em ambos os tratamentos (Figura 10 A e B). Apenas cerca de 15 % das células eram positivas para BrdU na situação controle, valor elevado em 1,7 vezes após tratamento com FGF2 (Figura 10 C). Esse resultado demonstra que FGF2 estimula a proliferação das células da CNT positivas para HNK1 com tratamento de 72 h, mas não de 48 h.

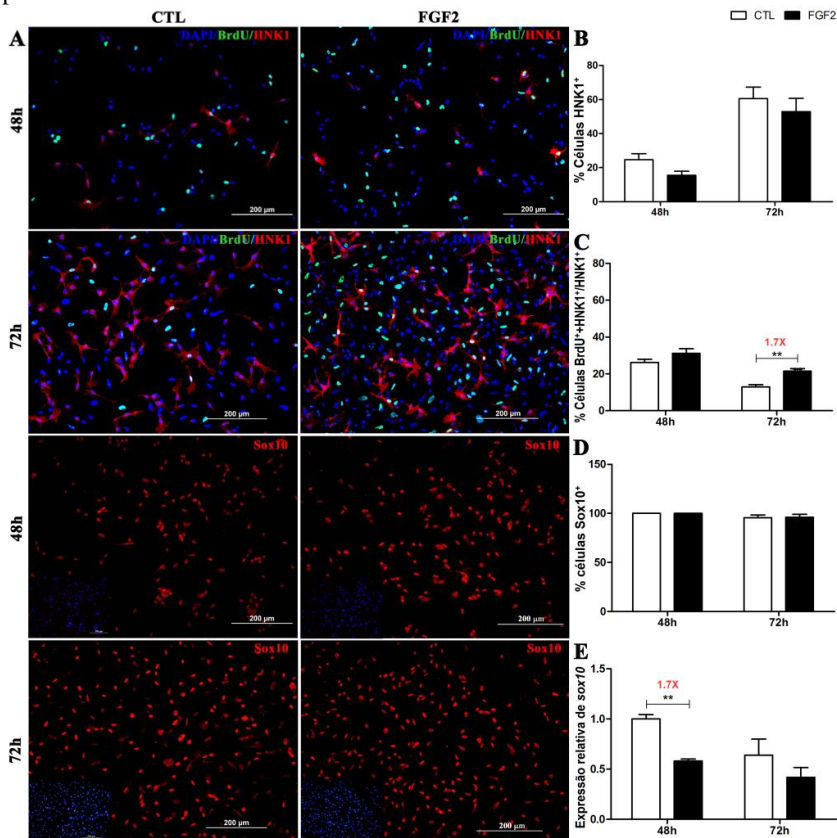
4.2.3 Padronização dos oligonucleotídeos iniciadores para experimentos de RT-qPCR

Antes da realização dos experimentos de expressão gênica relativa através de RT-qPCR, foi necessário padronizar todos os oligonucleotídeos utilizados. Para determinar a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores de *FoxD3*, *Sox10*, *Mitf* e *Mrps27* foi realizada uma curva de diluição de amostras. Para os iniciadores do *FoxD3*, *Sox10*, *Mitf* e *Mrps27*, foram realizadas diluições seriadas das amostras de 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e 3,1 ng. Após os experimentos, as eficiências para todos os oligonucleotídeos foram iguais ou próximas a 100 %. Desta forma, as eficiências foram consideradas adequadas para a utilização desses oligonucleotídeos iniciadores nas análises de expressão relativa.

Além disso, foi determinada a concentração ideal de cada oligonucleotídeo iniciador a ser usada para as reações de RT-qPCR. Levando-se em consideração o menor cT obtido após as reações, foi estabelecida a concentração de 0,3 μ M para os iniciadores de *Mrps27*, *FoxD3* e *Sox10* e de 0,5 μ M para os iniciadores de *Mitf*.

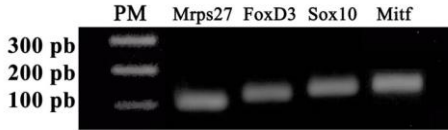
A especificidade da reação foi averiguada através de um gel de agarose a 2 %, onde foi possível verificar o tamanho do produto gerado nas reações de qPCR. A Figura 11 mostra que as reações foram específicas, pois geraram fragmento único do tamanho esperado (*Mrps27*: 103 pb, *FoxD3*: 113 pb, *Sox10*: 132 pb e *Mitf*: 151 pb). Após a padronização dos oligonucleotídeos, foi dado sequência aos experimentos de expressão gênica relativa por RT-qPCR.

Figura 10 – Efeito de FGF2 na expressão de HNK1 e Sox10 durante a fase de diferenciação celular. (A) Imunofluorescência para BrdU (verde), HNK1 (vermelho nas duas primeiras linhas) e Sox 10 (vermelho na 3ª e 4ª linhas). Os núcleos foram corados com DAPI. Análise da proporção de células positivas para (B) HNK1 em relação. (C) BrdU e HNK1 em relação ao número total de células HNK1 positivas e (D) Sox10 em relação ao número total de células. Foram observadas diferenças significativas no número de células HNK1 positivas em proliferação após 72 h de tratamento com FGF2 (** $p=0,0020$). (E) Expressão gênica relativa de *Sox10* por RT-qPCR. Foram observadas diferenças significativas na expressão de *Sox10* após 48 h de tratamento com FGF2 (** $p<0,0001$). Resultados obtidos de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado.



Fonte: do próprio autor (2017).

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2 %. Na imagem é possível observar que cada reação gerou um único produto de tamanho esperado de 103 pb para *Mrps27*, 113 pb para *FoxD3*, 132 pb para *Sox10* e 151 pb para *Mitf*. Os experimentos foram realizados em triplicata.



Fonte: do próprio autor (2017).

4.2.4 FGF2 reduz a expressão gênica de Sox10 em células da CNT durante a fase de diferenciação celular

Foram analisados a seguir os efeitos de FGF2 na expressão de Sox10, fator de transcrição máster na diferenciação da CN (BRITSCH, 2001). Toda população de células da CNT foi positiva para Sox10 em 48 e 72 h de cultura secundária na condição controle, sem alterações após tratamento com FGF2 (Figura 10 A e D). Para determinar as diferenças na expressão gênica deste fator de transcrição, foram realizadas análises de RT-qPCR.

As análises de expressão gênica através de RT-qPCR mostraram diminuição de 1,7 vezes na expressão do RNAm de *Sox10* nas células tratadas por 48 h com FGF2 em comparação com as células controle, porém sem diferenças significativas após 72 h de tratamento apesar de ter sido observada redução na expressão de *Sox10* (Figura 10 E). Estes resultados demonstram que FGF2 diminui a expressão gênica de *Sox10* nessas culturas, porém 100 % das células continuaram a ser positivas para esse fator de transcrição.

4.2.5 FGF2 reduz a expressão de Mitf em células da CNT durante a fase de diferenciação celular

Como nos experimentos anteriores havia-se observado a presença de células pigmentadas após 72 h de tratamento com FGF2 (Figuras 8 e 9), foi avaliada a seguir a expressão de Mitf, fator de transcrição máster da diferenciação melanocítica (LEVY; KHALED; FISHER, 2006). Os resultados demonstram que cerca de 40 % das células são positivas para Mitf em todas as condições avaliadas (Figura 12 A e B). Em culturas secundárias de 48 h, 60 % das células positivas para Mitf eram positivas também para BrdU em ambas condições de tratamento

demonstrando proliferação celular. No entanto, a taxa de proliferação dessas células foi reduzida para cerca de 40 % nas culturas de 72 h também sem diferença entre os tratamentos (Figura 12C). Esse resultado demonstra que as células *Mitf* positivas estão proliferando igualmente nas culturas controle e nas tratadas com FGF2, havendo redução de 20 % na taxa de proliferação celular de 48 para 72 h de cultura secundária.

Foi avaliada a seguir a expressão gênica deste fator de transcrição por RT-qPCR. Os resultados demonstram que a expressão do RNAm de *Mitf* reduz 2,9 vezes nas culturas controle da CNT de 48 para 72 h. FGF2 reduz em 1,3 vezes a expressão do RNAm para esse fator após 48 h de tratamento quando comparado com as médias do controle. Após 72 h de tratamento, FGF2 reduz a expressão de *Mitf* 2 vezes em relação a 48 h, porém, sem diferenças em relação ao controle nesse dia (Figura 12 D).

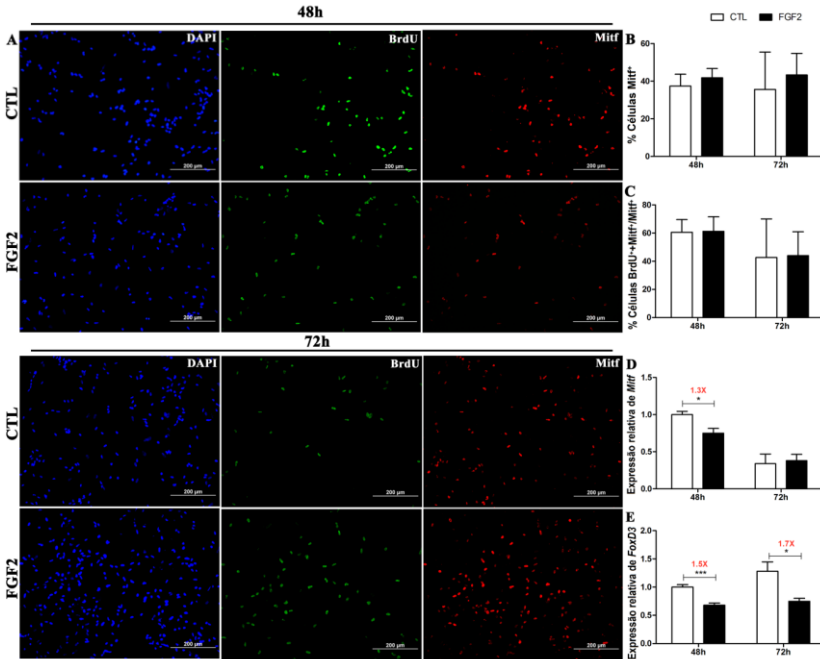
É importante destacar que apesar da população de células que expressam a proteína *Mitf* permanecer inalterada de 48 para 72 h de cultura, considerando número e taxa de proliferação celular, há redução na expressão do seu RNAm nesse período. Apesar de FGF2 não alterar o número de células da CNT positivas para *Mitf*, promove redução na expressão do seu RNAm com 48 h de tratamento.

4.2.6 FGF2 reduz a expressão de *FoxD3* em células da CNT durante a fase de diferenciação celular

Foi analisada, ainda, a expressão do RNAm de *FoxD3*, fator de transcrição também envolvido na diferenciação melanocítica (TENG et al., 2008). Os resultados de RT-qPCR demonstraram diminuição de 1,5 e 1,7 vezes após tratamento com FGF2 em culturas secundárias de 48 e 72 h, respectivamente, em relação às células controle (Figura 12 E).

Após a observação do padrão de expressão de alguns dos principais marcadores envolvidos na diferenciação e manutenção do estado de progenitor das células da CN, somados a observação de grande número de células pigmentadas após 72 h de tratamento com FGF2 e ao papel de FGF2 na autorrenovação de progenitores gliais descrito por Bittencourt e colaboradores (2013), foram realizados, a seguir, experimentos de diferenciação celular.

Figura 12 – Efeito de FGF2 na expressão de *Mitf* e *FoxD3* durante a fase de diferenciação das células da CNT. (A) Imunofluorescência para BrdU (verde) e *Mitf* (vermelho). Os núcleos totais foram corados com DAPI. Porcentagem de células positiva para (B) *Mitf* em relação ao número total de células e (C) *Mitf* e BrdU em relação ao número total de células positivas para *Mitf*. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado. (D) RT-qPCR da expressão gênica relativa de *Mitf*. Foram observadas diferenças significativas após 48 h de tratamento com FGF2 (* $p < 0,0134$) em relação ao controle. (E) RT-qPCR da expressão gênica relativa de *FoxD3*. Foram observadas diferenças significativas na expressão de *FoxD3* tanto após 48 h (** $p = 0,0006$) quanto após 72 h (* $p = 0,0285$) de tratamento com FGF2. Resultados obtidos de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado.



Fonte: do próprio autor (2017).

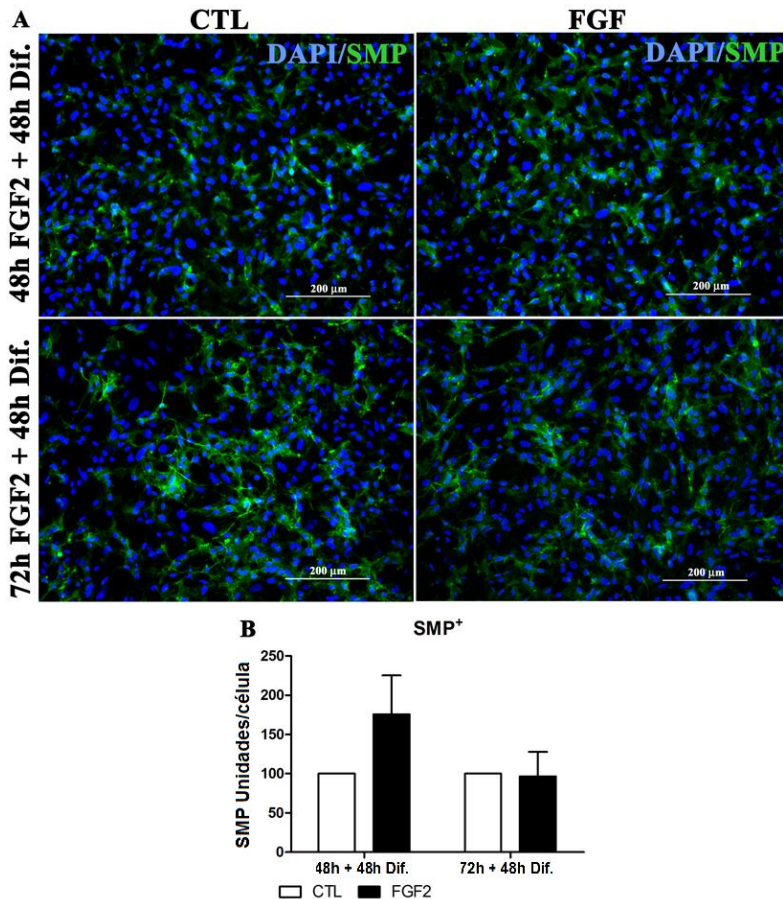
4.2.7 FGF2 influencia a diferenciação das células da CNT para os fenótipos glial e melanocítico

Para a investigação do papel do FGF2 na diferenciação das células da CNT para os fenótipos glial e melanocítico, as culturas secundárias foram tratadas por 48 ou 72 h com FGF2 e, em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo meio complexo indutivo de diferenciação celular por 48 h adicionais (48 ou 72 h de tratamento com FGF2 e mais 48 h em meio complexo para diferenciação). Após, as células foram submetidas às análises de marcação e quantificação da presença de células gliais e melanócitos.

A detecção de células gliais foi realizada por imunofluorescência para SMP que identifica células de Schwann (DUPIN et al., 1990). Os resultados mostraram aumento, embora sem significância estatística, na intensidade de fluorescência após tratamento com FGF2 em culturas de 48 h. Em 72 h, os valores de expressão de SMP foram similares em ambas as condições de tratamento (Figura 13).

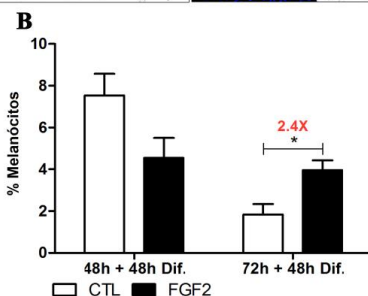
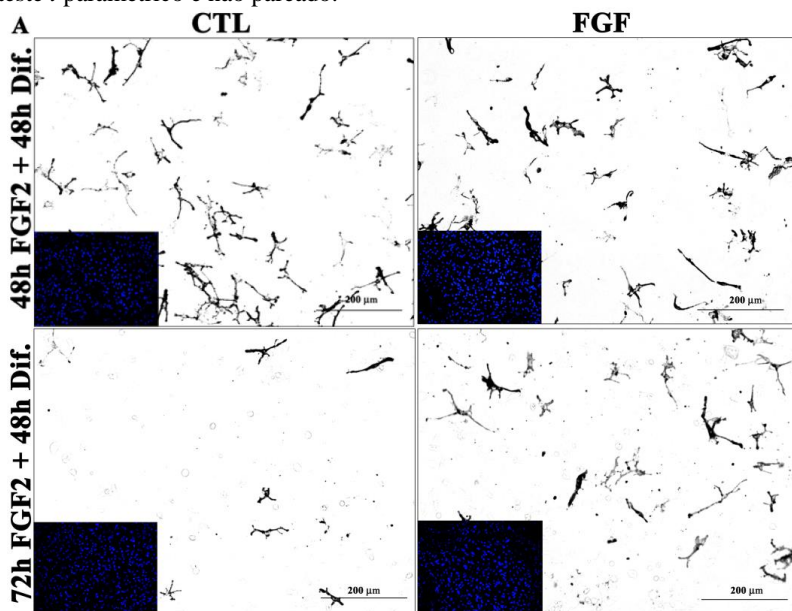
A detecção dos melanócitos foi realizada através da observação da presença de melanina em microscopia de contraste de fase (Figura 14). Após as análises, pôde-se observar uma grande diminuição na porcentagem média de melanócitos nas culturas controle de 48 h em relação às de 72 h, que passaram de cerca de 7,5 % para 2 % (4,1 vezes de redução). Nas culturas tratadas com FGF2 por 48 h, a proporção de melanócitos era cerca de 4 %, uma diminuição em relação às culturas controle nesse mesmo tempo, porém sem diferença estatística. Proporção essa que se manteve após 72 h de tratamento, representando aumento de 2,4 vezes em comparação com as culturas controle (Figura 14). Esses resultados sugerem que FGF2 mantém o número de melanócitos durante a cultura secundária, enquanto que na situação controle há uma drástica redução.

Figura 13 – Efeito de FGF2 na expressão de SMP em culturas de células da CNT. (A) Imunofluorescência para SMP. Os núcleos totais foram corados com DAPI. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência de SMP. Não houveram diferenças estatisticamente significativas nas médias de expressão de HNK1, tanto após 48h ($p=0,2692$), quanto após 72h ($p=0,9257$) de tratamento com FGF2 [10 ng/mL] em comparação com as culturas controle. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado. valores obtidos da intensidade de fluorescência de cada campo foram divididos pelo número de células totais do campo e os resultados obtidos estão demonstrados como unidades/célula.



Fonte: do próprio autor (2017).

Figura 14 – Efeito de FGF2 da diferenciação melanocítica das células da CNT. As células foram tratadas por 48 ou 72 h com FGF2 e em seguida submetidas à diferenciação em meio complexo. (A) Microscopia de campo claro evidenciando os melanócitos expressando melanina. Os núcleos totais foram corados com DAPI, coloração azul nas imagens minimizadas: DAPI; e contraste de fase: melanina no interior dos melanócitos. (B) porcentagem de melanócitos em relação ao número total de células. Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de melanócitos com 48h de tratamento com FGF2 [10 ng/mL] em comparação com as culturas controle ($p=0,1007$). Após 72 h de tratamento foi observado uma redução significativa em comparação com as culturas controle ($*p=0,0368$). Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A significância foi verificada através do teste *t* paramétrico e não pareado.

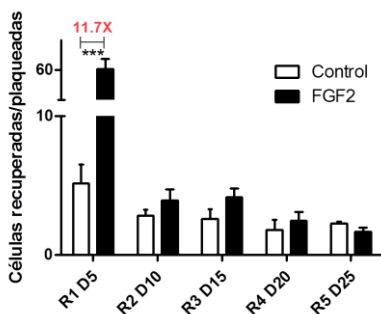


Fonte: do próprio autor (2017).

4.3 EFEITO DO FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT EM FENÓTIPOS MESENQUIMAIS

Com o objetivo de avaliar os efeitos do FGF2 na diferenciação das células da CNT em fenótipos mesenquimais, após as culturas primárias, as culturas secundárias foram mantidas em meio contendo FGF2 [10 ng/mL] durante 120 h (5 dias). Em seguida, parte das células foi submetida à diferenciação para fenótipos mesenquimais com meio indutivo mesenquimal, por 13 dias. Após o tratamento, as culturas foram fixadas e analisadas. Outra parte das células foi replaqueada e mantida na presença ou ausência de FGF2 durante 5 dias adicionais. A esta passagem deu-se o nome de R2. Ao final de 5 dias o processo se repetiu (parte das células para diferenciação e parte das células replaqueadas) até R5 (Figura 4). Estes resultados foram obtidos entre outubro de 2015 e setembro de 2016 no *Institut de la Vision* em Paris – França, sob a supervisão da Dra Elisabeth Dupin e com o auxílio financeiro do programa PDSE da CAPES.

Figura 15 – Efeito de FGF2 na propagação das células da CNT. Células da CNT em cultura secundária foram tratadas com FGF2 [10 ng/mL] durante 5 dias, repicadas e tratadas novamente com FGF2 por outros 5 dias até a R5. O gráfico apresenta a relação entre células recuperadas e células plaqueadas a cada passagem. Foi possível observar um aumento significativo em R1 (***) das culturas tratadas em comparação com as culturas controle. Não foram observadas diferenças significativas nas demais passagens ($p > 0,05$). Resultados obtidos de 3 experimentos independentes realizados em replicatas. A significância foi verificada através do teste ANOVA de 2 vias. As contagens das células foram realizadas em câmara de Neubauer após tripsinização das células.



Fonte: do próprio autor (2017).

4.3.1 FGF2 influencia a propagação das células da CNT

Para o cálculo do crescimento da população de células da CNT sob influência de FGF2, o número total de células recuperadas a cada repicagem foi dividido pelo número total de células plaqueadas. Os resultados mostram que na R1 houve aumento de 11,7X nesse valor. Tendência ao aumento nesta relação também foi observado em R2 a R4, porém, as diferenças não foram significativas (Figura 15). Esses dados demonstram que o maior efeito de FGF2 no crescimento da população de células da CNT ocorre no início do cultivo, na primeira passagem.

4.3.2 FGF2 influencia a diferenciação e propagação dos progenitores mesenquimais da CNT

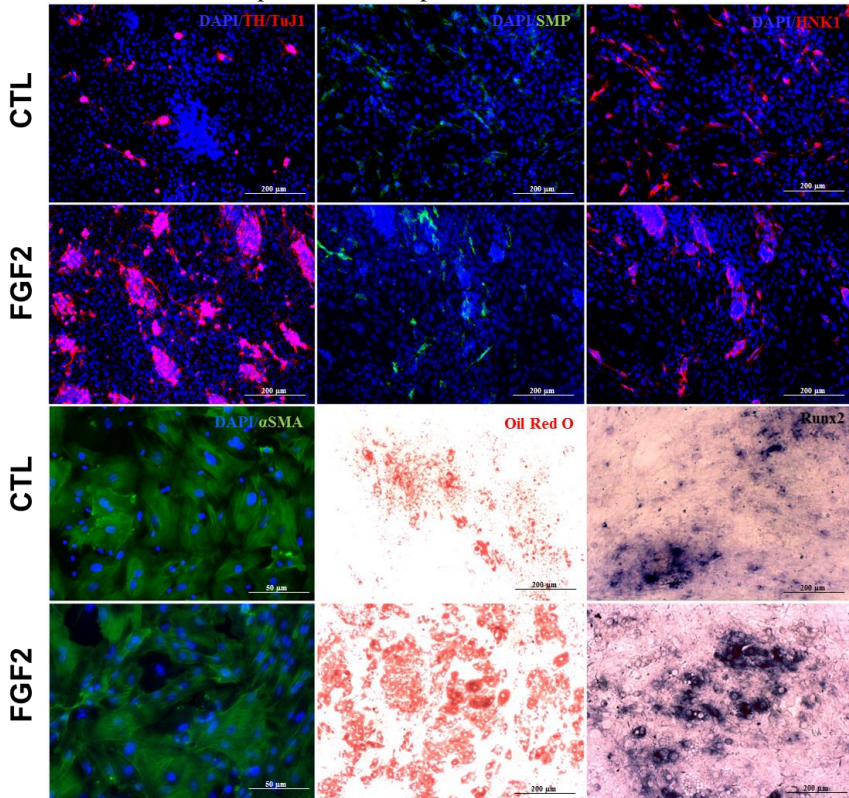
Conforme descrito acima, após o tratamento com FGF2, parte das células foram separadas e tratada com meio de diferenciação mesenquimal por 13 dias. A seguir, os fenótipos mesenquimais muscular liso, adipocítico e osteoblástico foram avaliados, além dos fenótipos neurais (glias e neuronal) e melanocítico.

Quadro 1 – Níveis de marcação de células da CNT em R1. As células da CNT foram tratadas ou não com FGF2 [10 ng/mL] durante 5 dias e, em seguida, submetidas à diferenciação em meio indutivo mesenquimal por 13 dias. O quadro representa os níveis de marcação observados através de imunocitoquímica, coloração citoquímica e hibridização *in situ* levando-se em consideração o total de células presentes no poço. Escala de quantidade de células: “+” = moderada, “++” alta. Os resultados representam as observações realizadas em 3 experimentos independentes.

Fenótipo	Marcação	
	R1	
	CTL	FGF2
Glia	+	++
Neurônios	+	++
Músculo liso	+	+
Osteoblastos	+	+
Adipócitos	+	++

Fonte: do próprio autor (2017).

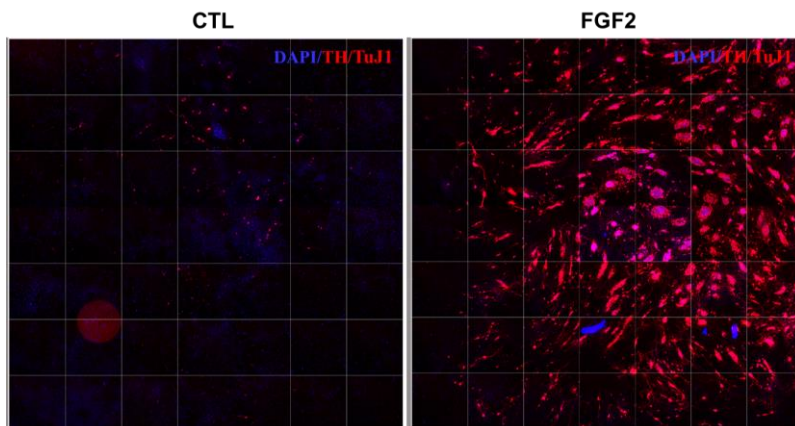
Figura 16 – Diferenciação de células da CNT (R1) para fenótipos neurais e mesenquimais. Nas imagens, 2 primeiras linhas e primeira coluna, coloração azul: DAPI. Na primeira coluna (2 primeiras linhas), coloração vermelha: imunocitoquímica com anticorpo anti-TH e anti-TuJ1, evidenciando células neuronais. Na segunda coluna (2 primeiras linhas), coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti-SMP, evidenciando células de Schwann. Na última coluna (2 primeiras linhas), coloração vermelha: imunocitoquímica com anticorpo anti-HNK1, evidenciando células gliais. Na primeira coluna (2 últimas linhas), coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti- α SMA, evidenciando células de músculo liso. Na coluna do meio (2 últimas linhas) coloração vermelha: citoquímica com corante *Oil Red O*, evidenciando adipócitos. Na última coluna (2 últimas linhas) coloração roxa: hibridização *in situ* com sonda para Runx2, evidenciando osteoblastos. As fotos representam os resultados obtidos de 3 experimentos independentes.



Fonte: do próprio autor (2017).

Os resultados demonstraram que, em R1, as culturas tratadas com FGF2 apresentaram maior proporção de células gliais, neurônios e adipócitos em relação às culturas controle. Não foram observadas diferenças nas proporções de músculo liso e osteoblastos entre as culturas tratadas e controle (Quadro 1 e Figura 16). Além disso, nas culturas tratadas foi observada a presença de gânglios neuronais, o que não foi constatado nas culturas controle (Figura 16 e Figura 17). As proporções foram geradas através da observação das culturas em microscópio epifluorescente invertido, levando-se em consideração o número de células totais através da marcação dos núcleos com DAPI.

Figura 17 – Imunofluorescência de células da CNT marcadas para tirosina hidroxilase (TH) e β -tubulina III (TuJ1) em R1. Nas imagens, coloração azul: DAPI, representando o total de células; e coloração vermelha: imunomarcagem com anticorpo anti-TH e anti-TuJ1, representando células neuronais. As células da CNT foram tratadas com FGF2 [10 ng/mL] ou mantidas na condição controle durante 5 dias e em seguida mantidas em meio de diferenciação mesenquimal por mais 13 dias. Nas culturas tratadas com FGF2 é possível observar a presença de inúmeros gânglios neuronais, o que não é observado nas culturas controle. As imagens foram geradas através do leitor automatizado de placas Thermo Scientific™ ArrayScan™ XTI Live High Content Platform. Os resultados representam observações realizadas em 3 experimentos independentes.



Fonte: do próprio autor (2017).

As análises realizadas nas demais passagens demonstraram aumento na proporção de neurônios e adipócitos e redução na de células

gliais em R2 nas culturas tratadas com FGF2 em relação às culturas controle. Não foram observadas diferenças na proporção dos outros fenótipos entre as culturas tratadas e controle. Em R3, ainda foi possível observar a presença de neurônios nas culturas tratadas, porém, este fenótipo não foi mais encontrado nas culturas controle. Além disso, o fenótipo adipogênico não foi mais encontrado, tanto nas culturas tratadas com FGF2, quanto nas culturas controle. Não foram observadas diferenças nas proporções dos outros fenótipos entre as culturas tratadas e as culturas controle nessa passagem. Em R4, ocorreu uma inversão na proporção de células gliais, sendo observado um aumento no número de células gliais nas culturas tratadas com FGF2 em comparação com as culturas controle. Além disso, não foram mais encontradas células neuronais em nenhuma condição de cultivo. Não foram observadas diferenças nas proporções dos outros fenótipos, tanto nas culturas tratadas, quanto nas culturas controle. Finalmente, em R5, foi observada maior proporção de células gliais nas culturas tratadas com FGF2 em relação às culturas controle. Não foram observadas diferenças nas proporções de músculo liso nem de osteoblastos entre as culturas tratadas com FGF2 e as culturas controle (Quadro 2 e Figura 18).

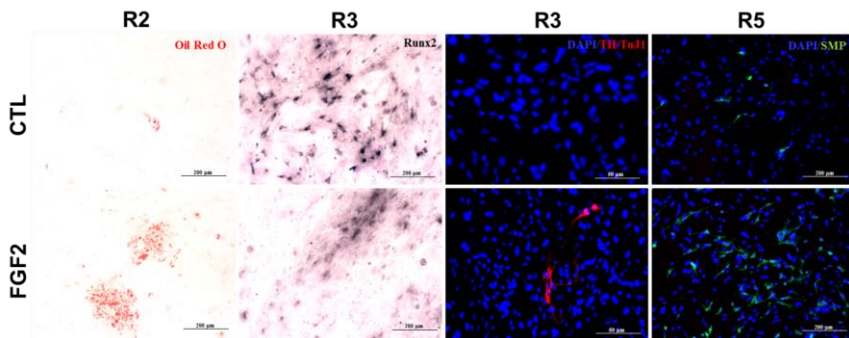
Quadro 2 – Níveis de marcação de células da CNT em R2-R5. As células da CNT foram tratadas ou não com FGF2 [10 ng/mL] durante 10-25 dias e, em seguida, submetidas à diferenciação em meio indutivo mesenquimal durante 13 dias. O quadro representa os níveis de marcação observados através de imunocitoquímica, coloração citoquímica e hibridização *in situ* levando-se em consideração o total de células presentes no poço. Escala de quantidade de células: “-“ = nenhuma, “±” = baixa “+” = moderada. Os resultados representam as observações realizadas em de 3 experimentos independentes.

Fenótipo	Marcação							
	R2		R3		R4		R5	
	CTL	FGF2	CTL	FGF2	CTL	FGF2	CTL	FGF2
Glia	+	±	+	+	±	+	±	+
Neur.	±	+	-	±	-	-	-	-
Músc. liso	+	+	+	+	+	+	+	+
Osteo.	+	+	+	+	+	+	+	+
Adipo.	±	+	-	-	-	-	-	-

Fonte: do próprio autor (2017).

Em conjunto, estes resultados apontam uma ação do FGF2 nos progenitores com potencial de diferenciação em células gliais, adipócitos, e mais visivelmente, nos progenitores neuronais, visto a formação de inúmeros gânglios neuronais em R1. Além disso, nas repicagens posteriores, o FGF2 foi capaz de manter os progenitores adipocíticos, neuronais e gliais em maior número e por um período maior do que o observado nas culturas controle. Aparentemente, FGF2 não influencia os progenitores de células de músculo liso nem de osteoblastos. Desta forma, dentre os fenótipos mesenquimais analisados, FGF2 exerce um papel na manutenção dos progenitores adipocíticos sem que haja, em contrapartida, a redução de outros progenitores, tanto mesenquimais quanto neurais.

Figura 18 – Diferenciação de células da CNT (R2-R5) para fenótipos neurais e mesenquimais. Primeira coluna, coloração vermelha: citoquímica com corante *Oil Red O*, evidenciando adipócitos. Segunda coluna, coloração roxa: hibridização *in situ* com sonda para *Runx2*, evidenciando osteoblastos. Na penúltima coluna, coloração azul: DAPI; e coloração vermelha: imunocitoquímica com anticorpo anti-TH e anti-TuJ1, evidenciando células neuronais. Na última coluna, coloração azul: DAPI; e coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti-SMP, evidenciando células de Schwann.



Fonte: do próprio autor (2017).

Para analisar a multipotencialidade dos progenitores das células da CNT com capacidade em se diferenciar em fenótipos mesenquimais, foram realizados experimentos de clonagens celulares.

4.3.3 Influência de FGF2 na multipotencialidade de progenitores mesenquimais e neurais das células da CNT

A multipotencialidade das células da CNT tratadas com FGF2 [10 ng/mL] durante 120 h foi determinada através de experimentos de clonagem. Nesses experimentos, após o tratamento com FGF2, uma única célula da CNT foi semeada por poço sobre monocamada de fibroblastos 3T3. As culturas clonais foram mantidas durante 13 dias em meio indutivo mesenquimal e, em seguida, foram fixadas e submetidas às análises fenotípicas. Além de osteoblastos, também foram analisados fenótipos neurais. As células adiposas não foram analisadas, uma vez que a presença de monocamada de 3T3 impossibilita este experimento.

Tabela 3 – Porcentagem de clones de células da CNT. As culturas secundárias de células da CNT foram tratadas ou não por 5 dias com FGF2 [10 ng/mL] e, em seguida, submetidas aos experimentos de clonagem celular sobre monocamada de células de 3T3. As células permaneceram em cultura durante 13 dias em meio indutivo mesenquimal. Resultados obtidos de 3 experimentos independentes. A significância foi verificada através do teste de Chi-quadrado.

	% do total dos clones	
	Controle	FGF2
	39,7	60,5
Progenitor		
G	74	79
GN	2	2,6
GO	24	18,4
Eficiência	23,3	

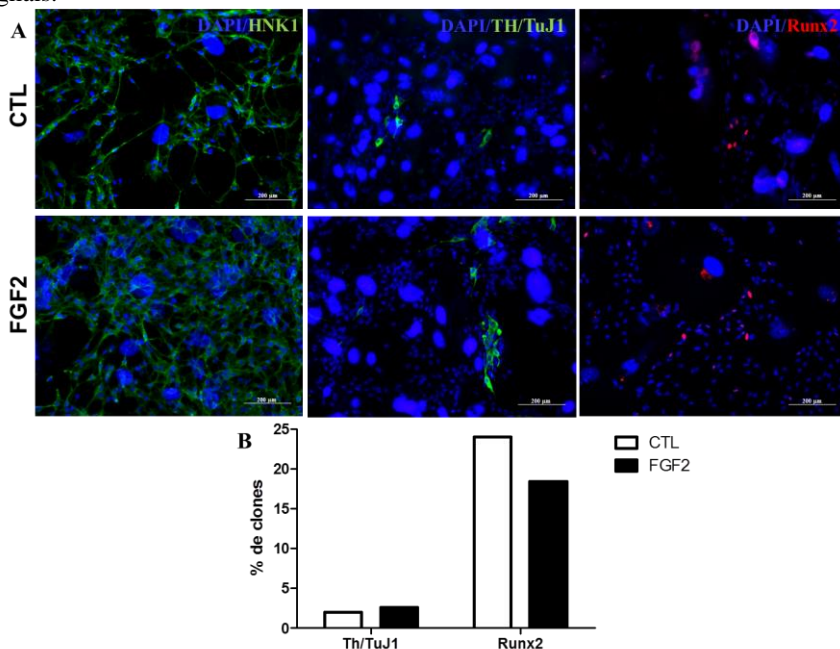
G - glia N - neurônio O – osteoblasto

Fonte: do próprio autor (2017).

A eficiência dos experimentos de clonagem foi de 23,3 %. Dos 540 poços plaqueados, 126 apresentaram clones, sendo estes 76 (60,3 %) provindos de células tratadas com FGF2 e 50 (39,7 %) provindos de células controle. Desta forma, FGF2 promoveu o aumento do número de células com capacidade de formar clones, porém este aumento não foi significativo. Após as análises dos resultados, foi possível observar que 100 % das culturas clonais possuíam células gliais e, em contrapartida, nenhuma das culturas clonais apresentaram clones com neurônios e osteoblastos ao mesmo tempo. Desta forma, foram encontrados progenitores com potencialidade somente glial (G), glial e neuronal (GN) e glial e osteoblástica (Tabela 3 e Figura 19). Não foram

observadas diferenças significativas na proporção de progenitores GN nem progenitores GO entre as culturas tratadas com FGF2 e as culturas controle. Desta forma, apesar da ação do FGF2 no aumento do número de células formadoras de colônias, as análises das porcentagens mostraram que este fator não está agindo sobre nenhum dos progenitores dos fenótipos analisados.

Figura 19 – Clones de células da CNT sobre monocamada de células 3T3 e induzidas à diferenciação para fenótipos neurais e mesenquimais após tratamento com FGF2 [10 ng/mL]. Nas imagens em A, coloração azul: DAPI, evidenciando os núcleos dos clones das células da CNT e da monocamada de células 3T3. Na primeira coluna, coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti-HNK1, evidenciando células gliais. Na segunda coluna, coloração verde: imunocitoquímica com anticorpo anti-TH e anti-TuJ1, evidenciando células neurais. Na última coluna, coloração vermelha: imunocitoquímica com anticorpo anti-Runx2, evidenciando melanoblastos. Em B, porcentagem de clones apresentando neurônios ou osteoblastos. Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de clones apresentando neurônios ($p=0,9745$) ou osteoblastos ($p=0,7508$) nas culturas tratadas com FGF2 em relação às culturas tratadas. Todos os clones apresentaram células gliais.



Fonte: do próprio autor (2017).

4.4 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- Durante da fase de migração das células da CNT, o FGF2 não altera a proliferação, o halo migração e nem o número total de células, porém diminui a expressão de HNK1.
- Em culturas secundárias de células da CNT os efeitos do FGF2 no aumento do número total de células é detectável somente a partir de 48 h de tratamento e, especialmente após 72 h, este maior número é alcançado graças ao aumento da proliferação celular e ao aumento na sobrevivência das células tratadas.
- FGF2 mantém a proporção de melanócitos nas culturas de células da CNT tratadas por 72 h, enquanto há uma diminuição na proporção destas células nas culturas controle. Além disso o tratamento com este fator não altera a proporção de células gliais presentes nas culturas.
- O tratamento com FGF2 modula a expressão de *Sox10*, *FoxD3* e *Mitf*.
- FGF2 promove a propagação de progenitores mesenquimais da CNT em culturas de massa por até 5 passagens, sem prejudicar os progenitores gliais e promovendo os progenitores neuronais.
- FGF2 não afeta a potencialidade dos progenitores mesenquimais das células da CNT.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que o FGF2 é responsável por uma série de alterações celulares e moleculares nas células da CNT. Estas alterações podem vir a modificar o seu destino final. Os resultados obtidos aqui reforçam, em conjunto com os dados já conhecidos na literatura, a importância do controle preciso da sinalização deste fator em relação a tempo e espaço durante o desenvolvimento dos vertebrados. Utilizando o modelo de codornas, neste trabalho foi analisado o efeito do FGF2 na migração e proliferação das células da CNT a partir de explantes do tubo neural e em culturas secundárias de massa em diferentes tempos de tratamento. Nestas últimas, também foi analisada a sobrevivência das células, a expressão de alguns marcadores chave no desenvolvimento da CN como um todo e a diferenciação final destas células para fenótipos eleitos com base em trabalhos anteriores e na observação dos resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por fim, foram avaliados os efeitos do FGF2 nos derivados mesenquimais da CNT, bem como na potencialidade dos progenitores mesenquimais da CNT através de experimentos de clonagem.

5.1 FGF2 NA FASE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT

A sinalização de FGF é fundamental para o desenvolvimento da CN desde o seu surgimento e especificação e, mais tarde, em sua diferenciação. Sabe-se que a expressão de FGF é espaço-temporal no desenvolvimento embrionário e ocorre em momentos diferentes no mesmo local, como também ao mesmo tempo em locais diferentes. Além disso, FGF está envolvido em processos que medeiam movimento e migração celular, como a gastrulação (THISSE; THISSE, 2005; STUHL MILLER; GARCÍA-CASTRO, 2012). Desta forma, investigou-se a ação do FGF2 no que diz respeito à migração, proliferação e número total de células encontradas após o período de migração das células da CNT a partir de explantes do tubo neural.

Após as análises dos halos de migração das culturas primárias, não foram constatadas diferenças entre as médias da área de migração dos halos das culturas tratadas com FGF2 em comparação com as culturas controle. Esses resultados demonstram que o FGF2 não influencia a capacidade migratória das células da CNT nas primeiras 24 h de cultura primária, apesar de já ter sido sugerida a influência deste

fator na migração das células da CN *in vivo* e *in vitro* (KUBOTA; ITO, 2000). Neste trabalho, os autores demonstraram que FGF2 exerce uma influência quimiotática na migração das células da CN. Com base nos resultados sugere-se que FGF2 não influencia diretamente a migração das células da CN, porém, conforme observado por Kubota e Ito (2000), pode desempenhar um papel instrutivo, guiando as células da CN durante o processo de migração.

Também não foram encontradas diferenças no número de células em proliferação nas culturas primárias tratadas com FGF2 em comparação com as culturas controle. Isto sugere que o aumento da proliferação das células da CN que ocorre durante a fase de migração, já descrito na literatura (MURPHY et al., 1994), é observado quando o tempo de exposição a este fator é maior e/ou as células são analisadas após permanecer em cultivo por mais tempo, o que pode permitir às células a responderem ao estímulo do FGF2. Ainda, não foram observadas diferenças no número total de células que migraram a partir do tubo neural nas culturas tratadas com FGF2 em comparação com as culturas controle, o que pode ser consequência da mesma taxa de proliferação observada em ambas as culturas, mas, além disso, esse resultado também permite sugerir que não há influência do FGF2 na sobrevivência das células nesse momento.

A expressão de HNK1 é característica de células da CN em migração e, posteriormente, de células da CN diferenciadas em fenótipos gliais e alguns neurônios que compõem o sistema nervoso periférico de aves (VINCENT; THIERY, 1984; GIOVANNONE et al., 2015). A diminuição da expressão de HNK1 após 24h de tratamento com FGF2 em culturas primárias sugere que este morfógeno pode estar afetando de alguma maneira a migração destas células, fazendo com que elas percam o perfil migratório, porém, sem que haja alterações no halo de migração que pudessem estar detectáveis no momento das análises. É importante salientar que não há dados na literatura evidenciando a influência de HNK1 no processo migratório das células da CN, porém, como mencionado acima, sua expressão é observada em células da CN em migração.

5.2 FGF2 NA FASE DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT

O FGF2 foi isolado primeiramente para ser utilizado como agente mitogênico para fibroblastos, desta forma, sua ação na proliferação celular é bem conhecida (ITOH; ORNITZ, 2011). Além disso, trabalho anterior do grupo de pesquisa do LACERT-UFSC já

demonstrou a ação do FGF2 na proliferação das células da CNT após 6 dias de tratamento (BITTENCOURT et al., 2013). No entanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de tratamento com FGF2 necessário para que as diferenças no número total de células em cultura sejam detectadas. Os resultados mostraram que o aumento no número total de células ocorre a partir de 48 h de tratamento com FGF2, ficando ainda mais evidente após 72 h de tratamento com o fator. Estes resultados corroboram dados anteriores do grupo de pesquisa do LACERT-UFSC, que mostram um grande aumento no número de células em análises realizadas após 6 dias ou mais de tratamento com FGF2 (BITTENCOURT et al., 2013; BRESSAN et al., 2014). Entretanto, nossas análises demonstram que somente a partir de 48 h de tratamento com FGF2 é que ocorre um aumento significativo no número de células, o que pode estar relacionado com o tempo de permanência em contato com o fator, com o estágio de responsividade da célula para o reconhecimento deste, ou ainda, com o tempo que as células precisam para responder às alterações na expressão de fatores de transcrição que o acionamento das vias de sinalização de FGF2 pode vir a desencadear.

Em seguida, buscando entender melhor o efeito do FGF2 no aumento do número de células totais, foram analisadas culturas secundárias tratadas por 24 h (de 48 a 72 h de cultura secundária) com este fator. Os resultados sugerem uma relação entre tempo de tratamento e responsividade das células para que se possa observar o aumento no número de células da CNT após a exposição ao FGF2, uma vez que o tratamento realizado apenas nas últimas 24 h de cultura secundária proporcionou um número de células intermediário entre a condição controle e o tratamento por 72 h com o morfógeno.

Em seguida, para compreender o aumento no número de células totais observado anteriormente, foram realizadas análises de proliferação e morte celular nas culturas tratadas por 48 e 72 h com FGF2. Foi constatado um aumento na proliferação das células em culturas secundárias da CNT após os dois tempos de tratamento com FGF2, o que corrobora os dados da literatura, que apontam FGF2 como um fator mitogênico regulador da proliferação das células da CNT (MURPHY et al., 1994; ZHANG; HOFFMANN; SIEBER-BLUM, 1997). O aumento da proliferação celular observado após 48 h de tratamento corresponde ao aumento no número total de células observado no mesmo tempo de tratamento. Porém, após 72 h de tratamento, o aumento na proliferação não justifica o aumento no número de células totais. Desta forma, foram realizadas análises de morte celular.

Os resultados demonstram que, além de aumentar a proliferação das células da CNT, FGF2 também aumenta a sobrevida destas células, diminuindo a taxa de morte celular. Ainda, estes resultados corroboram resultados anteriores do grupo de pesquisa do LACERT-UFSC, em que foi observada uma redução de 9 vezes na morte celular em culturas secundárias tratadas por 6 dias com FGF2 em comparação com as células controle (BITTENCOURT et al., 2013). Vale ressaltar que os resultados de morte celular obtidos são possivelmente subestimados, uma vez que a metodologia utilizada contabiliza apenas as células que estão em processo de morte e continuam aderidas às placas de cultura. Este fato, em conjunto com a observação da presença de grande número de células mortas nos sobrenadantes das culturas controles, nos permite sugerir que os efeitos do FGF2 na sobrevida das células CNT se sobrepõem aos efeitos de proliferação para o aumento do número total de células observado nas culturas tratadas em comparação às células controle. Esta afirmação é corroborada por Kalcheim (1989), que demonstrou a ação de FGF2 na sobrevida de derivados não-neuronais de células da CNT *in vivo* e *in vitro* sem que modificações na proliferação destas células fossem detectadas.

Foi durante estes experimentos que percebeu-se um grande número de células pigmentadas nas culturas tratadas com FGF2, o que poderia indicar uma ação deste fator na diferenciação melanocítica das células da CNT. Estes achados foram considerados importantes, uma vez que, FGF2 é altamente e constitutivamente secretado em células de melanoma, porém, não em melanócitos saudáveis (CHALKIADAKI et al., 2009; RODECK et al., 1991) e, ao mesmo tempo, sua sinalização é essencial para a progressão de melanomas (MEIER et al., 2003). Desta forma, mais adiante, decidiu-se analisar a ação deste fator no processo de diferenciação melanocítica das células da CNT.

A sinalização de FGF modula múltiplas funções biológicas, variando em tempo, duração e intensidade de expressão (THISSE; THISSE, 2005). Estudos propõem que a sinalização de FGF implica múltiplas proteínas e fatores de transcrição que são co-expressos com FGF, modulando a sinalização de FGF e/ou sendo modulados por ele (FÜRTHAUER et al., 2002; TSANG; DAWID, 2004). Desta forma, foram realizadas as análises da expressão de alguns fatores de transcrição e proteínas importantes para o processo de diferenciação e manutenção do estado indiferenciado das células da CNT em culturas secundárias que ficaram expostas ao FGF2 durante dois tempos de tratamento distintos, 48 e 72 h.

HNK1 é um marcador precoce de células da CN (BRONNER-FRASER, 1986) e a sua expressão é utilizada para seguir a migração de células da CN indiferenciadas (VINCENT; THIERY, 1984). Desta forma, mesmo que os resultados obtidos nas culturas secundárias não tenham apresentado diferenças na porcentagem de células expressando HNK1 após os dois tempos de tratamento com FGF2 em comparação com as culturas controle, foi observado que as células HNK1 positivas estão proliferando em maior proporção nas culturas tratadas com FGF2 durante 72 h. Trabalho anterior do grupo de pesquisa do LACERT-UFSC demonstrou, através de ensaios de clonagens e subclonagens, que o tratamento das células da CNT com FGF2 aumenta a proporção e estimula a autorrenovação de progenitores multi, tri e bipotentes, em especial o progenitor multipotente GMNF (G: glial, M: melanócito, N: neuronal e F: células de músculo liso) e o progenitor tripotente GMF (BITTENCOURT et al., 2013). Então, aqui há mais uma evidência de que o FGF2 pode estar promovendo a proliferação de células indiferenciadas da CNT.

O dado mais relevante desta parte do trabalho foi demonstrar que o tratamento com FGF2 preserva os progenitores da CNT após 72 h de cultura secundária, em particular os progenitores com potencialidade melanocítica. A expressão de *Sox10* também é característica de células da CN indiferenciadas e a sua expressão bloqueia a diferenciação das células para os fenótipos glial e de músculo liso (KIM et al., 2003; PARATORE et al., 2001). No entanto, a perda de sua expressão causa diversas malformações em estruturas derivadas da CN, especialmente pela ausência de células gliais e melanócitos. Desta forma, a expressão de *Sox10* possui um papel na manutenção da multipotencialidade das células da CN e, ao mesmo tempo, exerce um papel no controle da diferenciação destas células (BRITSCH, 2001; KUHLBRODT et al., 1998). Além disso, a expressão de *Sox10* também está envolvida na proliferação dos melanócitos da pele, em parte, pela regulação da expressão de *Mcm5*, um fator que controla o ciclo celular tanto de células normais quanto de células cancerosas (SU et al., 2017).

Desta forma, o balanço da expressão de *Sox10* é crucial para as células-tronco melanocíticas, uma vez que o bloqueio total de sua expressão causa a perda destas células e, por outro lado, sua superexpressão causa a diferenciação prematura dos melanócitos. Para o estabelecimento e manutenção das células-tronco melanocíticas, *Sox10* precisa manter uma expressão baixa (HARRIS et al., 2013). Assim, os resultados indicam que FGF2 pode estar agindo na sobrevivência dos progenitores da CNT com potencial melanocítico, uma vez que o

tratamento reduziu a expressão de *Sox10*, o que é crucial para manutenção dos progenitores de melanócitos e a sua multipotencialidade.

Além disso, as porcentagens de melanócitos encontradas nas culturas tratadas durante 48 e 72 h com FGF2 e induzidas à diferenciação não sofreram alteração (tratamento 48 h x tratamento 72 h), e, hipoteticamente, se FGF2 estivesse estimulando a proliferação dos progenitores melanocíticos, as médias de melanócitos encontrados em 72 h deveriam ser superiores às encontradas em 48 h. Este fato reforça a hipótese de que, mesmo que a expressão proteica de *Sox10* tenha sido encontrada em quase todas as células, a redução da expressão gênica de *Sox10* sugere que FGF2 possui um papel na sobrevivência dos progenitores melanocíticos da CNT através da regulação da expressão de *Sox10*.

A superexpressão de *FoxD3*, outro fator de transcrição analisado neste trabalho, aumenta a expressão de HNK1 nas células da CN e as mantém indiferenciadas como durante a fase de migração. A sua expressão é reduzida gradualmente conforme as células vão se diferenciando e este fator de transcrição impede as células da CN de alcançarem a sua diferenciação final se sua expressão se mantiver constante (DOTTORI et al., 2001). O bloqueio da expressão de *FoxD3* impede a proliferação de alguns progenitores da CN *in vivo*, causando diversas malformações nas estruturas derivadas da CN (TENG et al., 2008). Os resultados demonstraram uma redução na expressão de *FoxD3* após 48 e 72 h de tratamento com FGF2, o que corrobora os resultados encontrados sobre a diferenciação melanocítica, uma vez que *FoxD3* é importante para o destino melanocítico das células da CN, pois sua expressão bloqueia a melanogênese estimulando a gliogênese ou algum outro fenótipo não específico (KOS et al., 2001; NITZAN et al., 2013).

Embora não tenham sido encontradas diferenças nos níveis de expressão de marcadores gliais entre as células tratadas e as controle após a indução à diferenciação, os resultados anteriores do LACERT-UFSC demonstraram um aumento na proporção de progenitores multi e tripotentes com potencial de diferenciação glial após várias subclonagens de culturas de células da CNT tratadas com FGF2, porém, nestes experimentos, a quantificação das células gliais presentes nas culturas não foi realizada, uma vez que a abordagem era outra (BITTENCOURT et al., 2013). Aqui, demonstra-se que a quantidade de células gliais presentes nas culturas tratadas com FGF2 não é diferente da encontrada nas culturas controle, além disso, em conjunto com os resultados discutidos anteriormente, há evidências de que os

progenitores das células da CNT, estimulados por FGF2, são induzidos ao destino melanocítico, mas não às expensas do destino glial.

Muitos genes necessários para a produção da melanina (*TYR*, *TYRP1* e *TYRP2*), diferenciação de melanócitos (*TYR*, *TIRP1*, *SLUG*, etc), proliferação (*CDK2*, *CDK4*, *p16*, etc) e sobrevivência (*BCL2* e *HIF1a*) são regulados por *Mitf* (LEVY; KHALED; FISHER, 2006; D'MELLO et al., 2016). Por esta razão, *Mitf* é considerado um regulador chave na melanogênese. Entretanto, as células-tronco melanocíticas adultas, localizadas no bulge do folículo piloso, mantém a expressão de *Mitf* em baixos níveis, o que bloqueia a diferenciação final, mantendo um nicho quiescente de células-tronco com ciclo celular lento, prontas para serem ativadas a cada ciclo capilar (NISHIMURA, 2011; MORT; JACKSON; PATTON, 2015). Altos níveis de expressão de *Mitf* é importante para a diferenciação de melanócitos mas não para o estabelecimento de uma população de células-tronco melanocíticas (JOHNSON; NGUYEN; LISTER, 2011). A redução na expressão de *Mitf* causada pelo tratamento com FGF2 pode estar promovendo a sobrevivência nos progenitores de células da CNT com potencial melanocítico que se diferenciam em melanócitos após a substituição do meio contendo FGF2 pelo meio de diferenciação. Isto é evidente depois de 72 h de tratamento com FGF2 e indução à diferenciação, uma vez que a porcentagem de melanócitos presentes nas culturas controle decai em relação às culturas controle de 48 h, enquanto as culturas tratadas com FGF2, a mantém. Além disso, as células-tronco melanocíticas mantêm a expressão de *Mitf*, embora em baixos níveis (MORT; JACKSON; PATTON, 2015), o que explica o fato de não termos observado diferenças no número de células expressando a proteína *Mitf*, uma vez que os ensaios de imunomarcacão determinam a quantidade de células expressando, porém não estima a quantificação de expressão de cada célula, o que foi verificado através das análises dos níveis de expressão gênica.

É importante salientar que a CN é composta por uma população de células altamente heterogênea e a diferenciação destas células ocorre de forma progressiva, de maneira que as células vão diferenciando e especificando para um fenótipo a cada divisão, passando por estágios de progenitores multi, tri e bipotentes, mas não necessariamente ao mesmo tempo (LE DOUARIN; DUPIN, 2003). Finalmente, os resultados obtidos na fase de diferenciação das células da CNT de codornas sugerem que o tratamento com FGF2 promove a sobrevivência dos progenitores com potencial de diferenciação melanocítica sem afetar a diferenciação glial. Além disso, o tratamento com FGF2 altera o balanço

de expressão dos fatores de transcrição *Sox10*, *FoxD3* e *Mitf*, destacando a possível utilização de FGF2 e da expressão destes fatores em terapias e diagnósticos de doenças relacionadas à crista neural, em especial as que envolvem distúrbios de pigmentação/células pigmentadas.

5.3 FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DE FENÓTIPOS MESENQUIMAIS

As células da CNT não dão origem a fenótipos mesenquimais *in vivo* (LE DOUARIN; DUPIN, 2012). No entanto, recentemente o grupo da Dra Elisabeth Dupin no *Institut de la Vision* em Paris, demonstrou que as células da CNT de aves são capazes de se diferenciar em osteócitos e adipócitos através do cultivo destas células *in vitro* na presença de hormônios e fatores de diferenciação (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013). Além disso, como já mencionado na introdução deste trabalho, estes fenótipos mesenquimais compartilham progenitores gliais e neuronais. Ainda, células da CNT de camundongos foram capazes de se diferenciar em condrócitos após o tratamento com FGF2 (IDO; ITO, 2006), além da já discutida capacidade das células da CNT em dar origem aos fenótipos mesenquimais *in vivo* e *in vitro* (DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010), o que deu um suporte maior para a investigação da ação deste fator na diferenciação dos fenótipos mesenquimais das células da CNT de aves.

Os resultados obtidos quanto ao número total de células após o tratamento com FGF2 nesta etapa do trabalho diferem dos resultados observados anteriormente devido ao modo de plaqueamento (em gotas) e tempo de permanência em exposição ao fator (5 dias), além disso, foram realizadas um total de 5 repicagens, sempre repetindo o processo. Aparentemente, plaqueando as células da CNT em alta densidade favorece o efeito proliferativo de FGF2. No entanto, o aumento significativo no número total de células foi observado somente em R1 e não nas demais 4 passagens (R2-5). Num primeiro olhar, esse fato leva a crer que as células podem ter perdido a expressão do receptor de FGF2 e, por isso, deixaram de responder ao seu estímulo. Porém, essa teoria não explica como as células ainda continuaram a responder aos outros estímulos do FGF2 que não os de proliferação. O fato é que FGF2 pode se ligar em 3 dos 4 receptores de FGF, sendo que cada receptor pode desencadear uma resposta celular diferente (GONG, 2014). Neste caso, sugere-se que, após R1, as células da CNT possivelmente deixaram de expressar o receptor (ou receptores) de FGF2 responsável por desencadear a atividade mitótica. Desta forma, as células não proliferaram como o esperado, porém, ainda responderam aos estímulos

de FGF2, como se pode perceber ao observar os resultados da indução à diferenciação.

Em geral, as células da CN podem ser mantidas em cultura por um tempo limitado, sem que ocorram alterações morfológicas e perdas na capacidade de autorenovação e diferenciação (DUPIN; COELHO-AGUIAR, 2013). Desta forma, há muito tempo busca-se estabelecer uma cultura permanente de células da CN com o objetivo de utilização destas células para pesquisa básica e, mais além, para aplicação em terapias de doenças relacionadas com células e tecidos de origem da CN. Mais recentemente, foram publicados trabalhos em que foi demonstrado ser possível a preservação das características de células-tronco das células da CN por várias passagens em culturas de esferas (WONG et al., 2006; KEROSUO et al., 2015). Porém, ainda não se tem conhecimento de uma linhagem de células da CN que preserve todo o seu potencial.

Neste trabalho, com a utilização de FGF2, o potencial de diferenciação mesenquimal e neural das células da CNT foi mantido por até 5 passagens (R5). No entanto, mesmo alcançando um maior potencial e por mais passagens em comparação com as células controle, as células foram perdendo a capacidade de diferenciação para alguns fenótipos conforme o avanço das passagens. As culturas tratadas com FGF2 foram capazes de manter o potencial de diferenciação adipogênico até a R1, neuronal até R3 e maior proporção de células gliais até R5. Ambas as culturas, tratadas e controle, mantiveram a mesma proporção de osteoblastos e células de músculo liso até R5.

O resultado mais expressivo observado foi em relação à diferenciação das células neuronais, onde o tratamento com FGF2 promoveu a formação de grande quantidade de gânglios neuronais após a indução das células à diferenciação. Estudo prévio utilizando o tratamento de FGF2 em culturas de células da CN de camundongos mostrou que o tratamento com FGF2 e posterior tratamento com um indutor da neurogênese fez com que 50 % das células em cultura diferenciassem para o fenótipo neuronal, enquanto apenas 15 % das células nas culturas não tratadas com FGF2 tiveram o mesmo destino (MURPHY et al., 1994). Desta forma, FGF2 promove primeiramente a proliferação de precursores neurais que, após o devido estímulo, diferenciam-se em neurônios.

O tratamento de células da CNC com FGF8 promove a adipogênese com a contrapartida da diminuição da osteogênese (SHAO et al., 2015). Porém, os resultados mostraram um grande aumento no número de adipócitos nas culturas tratadas com FGF2 sem alterações na

potencialidade osteogênica das células da CNT. A osteogênese é tida como antagonista da adipogênese em alguns casos, uma vez que a perda de massa óssea na medula é acompanhada geralmente do aumento da adipogênese (SHAO et al., 2015). No entanto, aparentemente o aumento da adipogênese observado nos resultados não é uma consequência da inibição da osteogênese. Os mecanismos da ação dos FGFs no aumento da adipogênese ainda é uma questão a ser elucidada.

Além disso, trabalho anterior do LACERT-UFSC demonstrou um grande efeito de FGF2 nos progenitores da CNT com potencial glial ao longo de várias clonagens e subclonagens (BITTENCOURT et al., 2013). No entanto, os resultados mostram que o efeito do FGF2 na propagação dos progenitores mesenquimais da CNT não afeta a propagação dos progenitores gliais, uma vez que o tratamento com FGF2 foi capaz de promover a propagação destes progenitores até R5 em maior quantidade em comparação com as culturas controle.

Ainda, nos experimentos de clonagens, pode-se observar que o tratamento com FGF2 não foi capaz de alterar significativamente a potencialidade dos progenitores dos fenótipos analisados. Desta forma, em conjunto com os demais resultados, sugere-se que, em culturas de massa, o FGF2 estimula a propagação de progenitores mesenquimais de células da CNT, sem que haja prejuízo aos fenótipos neurais e gliais. Pelo contrário, FGF2 promove grande aumento na quantidade de neurônios encontrados nas culturas. Por outro lado, em experimentos clonais, nas condições utilizadas, FGF2 parece não influenciar a potencialidade dos progenitores mesenquimais da CNT de aves.

Por fim, este estudo traz novas informações a respeito da habilidade da sinalização de FGF2 em controlar o processo de diferenciação das células da CNT, o que é válido para a possível modulação ou até mesmo troca da especificação fenotípica destas células através da administração de FGF2. Mais estudos visando entender os mecanismos intrínsecos e extrínsecos que conduzem o desenvolvimento e destino das células da CN vão permitir o progresso no tratamento e prevenção de doenças e síndromes relacionadas às células da CN.

6 CONCLUSÕES

Ao fim do trabalho pode-se concluir que a sinalização do FGF2 não altera o halo de migração, a proliferação e nem a sobrevida das células da CNT na fase de migração. Porém, este tratamento modifica a expressão do marcador HNK1, o que pode indicar que este fator está influenciando de alguma forma a migração das células. No entanto, com as metodologias utilizadas, não foi possível elaborar conclusões mais específicas. As modificações causadas por FGF2 em culturas secundárias da CNT quanto ao número total de células são observadas somente após 48 h de tratamento e este aumento é alcançado devido ao estímulo na proliferação celular e, após 72 h de tratamento, especialmente em função do estímulo à sobrevida das células. Além disso, FGF2 estimula a proliferação de células da CNT indiferenciadas e a sobrevida dos progenitores com potencialidade melanocítica, sem modificar a potencialidade glial. Para tanto, FGF2 modula o balanço da expressão dos fatores de transcrição *Sox10*, *FoxD3* e *Mitf*. Ainda, FGF2 estimula a propagação dos progenitores mesenquimais da CNT por até 5 passagens sem que ocorram perdas dos progenitores gliais em contrapartida. Ao mesmo tempo, FGF2 promove os progenitores neuronais das células da CNT, estimulando o surgimento de gânglios neuronais nas culturas e promovendo sua propagação até R3. Porém, a sinalização de FGF2 não promove a potencialidade dos progenitores mesenquimais da CNT para os fenótipos analisados. Os resultados obtidos no presente trabalho são de extrema importância para a ampliação dos conhecimentos dos efeitos da sinalização do FGF2 nos processos da CNT embrionária. Estas informações podem ser de grande valia para fundamentar novas pesquisas básicas, além de servir como fonte de informação e inspiração para pesquisas mais aplicadas na busca da prevenção e cura de doenças envolvendo células e estruturas originadas a partir da CNT e, até mesmo, da CN em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAREMBAUM, M.; BRONNER-FRASER, M. Early steps in neural crest specification. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 16, n. 6, p. 642–6, dez. 2005.
- BITTENCOURT, D. A. et al. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes the Self-Renewal of Bipotent Glial Smooth Muscle Neural Crest Progenitors. **Stem cells and development**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 11 jan. 2013.
- BÖTTCHER, R. T.; NIEHRS, C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 1, p. 63–77, fev. 2005.
- BRESSAN, R. B. et al. EGF–FGF2 stimulates the proliferation and improves the neuronal commitment of mouse epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSCs). **Experimental Cell Research**, v. 327, n. 1, p. 37–47, set. 2014.
- BRITO, J. M.; TEILLET, M.-A.; LE DOUARIN, N. M. An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11607–12, 1 ago. 2006.
- BRITSCH, S. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. **Genes & Development**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 1 jan. 2001.
- BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Developmental biology**, v. 115, n. 1, p. 44–55, maio 1986.
- BRONNER, M. E. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. **Histochemistry and cell biology**, v. 138, n. 2, p. 179–86, 22 ago. 2012.
- BRONNER, M. E.; LEDOUARIN, N. M. Development and evolution of the neural crest: an overview. **Developmental biology**, v. 366, n. 1, p.

2–9, 1 jun. 2012.

CALLONI, G. W. et al. 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, 11 dez. 2007.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 8947–52, 2 jun. 2009.

CHALKIADAKI, G. et al. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1323–1331, jun. 2009.

COELHO-AGUIAR, J. M.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Environmental factors unveil dormant developmental capacities in multipotent progenitors of the trunk neural crest. **Developmental Biology**, v. 384, n. 1, p. 13–25, 1 dez. 2013.

COHEN, A. M.; KONIGSBERG, I. R. A clonal approach to the problem of neural crest determination. **Developmental biology**, v. 46, n. 2, p. 262–80, out. 1975.

COSTA-SILVA, B. et al. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 6, p. 955–967, 1 abr. 2009.

CRANE, J. F.; TRAINOR, P. A. Neural crest stem and progenitor cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 267–286, jan. 2006.

CREUZET, S. et al. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. **Development (Cambridge, England)**, v. 129, n. 18, p. 4301–13, set. 2002.

D’MELLO, S. et al. Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1144, 15

jul. 2016.

DOREY, K.; AMAYA, E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 137, n. 22, p. 3731–42, nov. 2010.

DORSKY, R. I.; MOON, R. T.; RAIBLE, D. W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. **Nature**, v. 396, n. 6709, p. 370–3, 26 nov. 1998.

DOTTORI, M. et al. The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 21, p. 4127–38, nov. 2001.

DUPIN, E. et al. Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-Schwann cell myelin protein monoclonal antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 3, p. 1119–1123, 1 fev. 1990.

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. **Cell Cycle**, v. 9, n. 2, p. 238–49, 15 jan. 2010.

DUPIN, E.; COELHO-AGUIAR, J. M. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 1, p. 38–47, jan. 2013.

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

FÖRANDER, P.; BROBERGER, C.; STRÖMBERG, I. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor induces nerve fibre formation in primary cultures of adrenal chromaffin cells. **Cell and Tissue Research**, v. 305, n. 1, p. 43–51, 1 jul. 2001.

FUJITA, K. et al. Interaction between NF- κ B signaling and Notch signaling in gliogenesis of mouse mesencephalic neural crest cells.

Mechanisms of Development, v. 128, n. 7–10, p. 496–509, set. 2011.

FÜRTHAUER, M. et al. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 170–4, fev. 2002.

GANS, C.; NORTHCUTT, R. G. Neural Crest and the Origin of Vertebrates: A New Head. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 268–273, 15 abr. 1983.

GARCEZ, R. C. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087–91, dez. 2009.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Developmental Biology**. 11th. ed. [s.l.] Sinauer Associates, Inc., 2016 Softcover, 2016.

GIOVANNONE, D. et al. Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 255–266, abr. 2015.

GONG, S.-G. Isoforms of Receptors of Fibroblast Growth Factors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 12, p. 1887–1895, dez. 2014.

GRAHAM, A. The neural crest. **Current Biology**, v. 13, n. 10, p. R381–4, 13 maio 2003.

GRAHAM, A.; BEGBIE, J.; MCGONNELL, I. Significance of the cranial neural crest. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 229, n. 1, p. 5–13, jan. 2004.

GREEN, S. A.; SIMOES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Evolution of vertebrates as viewed from the crest. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 474–482, 22 abr. 2015.

HALL, B. K. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. **Evolution and Development**, v. 2, n. 1, p. 3–5, fev. 2000.

HARRIS, M. L. et al. A Dual Role for SOX10 in the Maintenance of the Postnatal Melanocyte Lineage and the Differentiation of Melanocyte Stem Cell Progenitors. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 7, p. e1003644, 25 jul. 2013.

HARRIS, M. L.; ERICKSON, C. A. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 1, p. 1–19, jan. 2007.

HUANG, X.; SAINT-JEANNET, J.-P. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. **Developmental Biology**, v. 275, n. 1, p. 1–11, 1 nov. 2004.

IDO, A.; ITO, K. Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 235, n. 2, p. 361–7, fev. 2006.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **Journal of biochemistry**, v. 149, n. 2, p. 121–30, mar. 2011.

JOHNSON, S. L.; NGUYEN, A. N.; LISTER, J. A. Mitfa is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell. **Developmental Biology**, v. 350, n. 2, p. 405–413, 2011.

KALCHEIM, C. Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest. **Developmental biology**, v. 134, n. 1, p. 1–10, jul. 1989.

KALCHEIM, C. Epithelial–Mesenchymal Transitions during Neural Crest and Somite Development. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1, 25 dez. 2015.

KEROSUO, L. et al. Crestospheres: Long-Term Maintenance of Multipotent, Premigratory Neural Crest Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 499–507, out. 2015.

KIM, J. et al. SOX10 Maintains Multipotency and Inhibits Neuronal

Differentiation of Neural Crest Stem Cells. **Neuron**, v. 38, n. 1, p. 17–31, abr. 2003.

KOS, R. et al. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 8, p. 1467–79, abr. 2001.

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

KUHLBRODT, K. et al. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 237–50, 1 jan. 1998.

KURIYAMA, S.; MAYOR, R. Molecular analysis of neural crest migration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1495, p. 1349–1362, 12 abr. 2008.

LE DOUARIN, N.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. v. 28

LE DOUARIN, N. M.; CALLONI, G. W.; DUPIN, E. The stem cells of the neural crest. **Cell Cycle**, v. 7, n. 8, p. 1013–1019, 15 abr. 2008.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Multipotentiality of the neural crest. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 5, p. 529–536, out. 2003.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. The neural crest in vertebrate evolution. **Current opinion in genetics & development**, v. 22, n. 4, p. 381–9, ago. 2012.

LEFEVRE, G. et al. Activation of the FGF2/FGFR1 Autocrine Loop for Cell Proliferation and Survival in Uveal Melanoma Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 3, p. 1047, 1 mar. 2009.

LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends in**

Molecular Medicine, v. 12, n. 9, p. 406–414, set. 2006.

LI, F. et al. Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation of neural crest cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10133–7, 6 abr. 2007.

LWIGALE, P. Y. Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis. **Development**, v. 131, n. 9, p. 1979–1991, 31 mar. 2004.

MASON, I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 583–596, ago. 2007.

MEIER, F. et al. Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. **Experimental dermatology**, v. 12, n. 3, p. 296–306, jun. 2003.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development (Cambridge, England)**, v. 142, n. 4, p. 620–32, 2015.

MUNDELL, N. A; LABOSKY, P. A. Neural crest stem cell multipotency requires Foxd3 to maintain neural potential and repress mesenchymal fates. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 4, p. e1–e1, 15 fev. 2011.

MUÑOZ, W. A.; TRAINOR, P. A. Neural Crest Cell Evolution. In: **Neural Crest and Placodes. Current Topics in Developmental Biology**, v. 111, p. 3–26, 2015.

MURPHY, M. et al. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n. 12, p. 3519–28, dez. 1994.

NISHIMURA, E. K. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 401–410, jun. 2011.

NITZAN, E. et al. Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31, p. 12709–12714, 30 jul. 2013.

NOISA, P.; RAIVIO, T. Neural crest cells: From developmental biology to clinical interventions. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 102, n. 3, p. 263–274, set. 2014.

NONES, J. et al. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. **Cell and Tissue Research**, v. 350, n. 2, p. 305–315, nov. 2012.

PARATORE, C. et al. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 20, p. 3949–61, out. 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 1 maio 2001.

PORTELA, V. M. et al. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1167–1174, 1 dez. 2011.

PRASAD, M. S.; SAUKA-SPENGLER, T.; LABONNE, C. Induction of the neural crest state: Control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. **Developmental Biology**, v. 366, n. 1, p. 10–21, jun. 2012.

REISSMANN, E. et al. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. **Development**, v. 122, n. 7, p. 2079–88, jul. 1996.

RODECK, U. et al. Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 97, n. 1, p. 20–6, jul. 1991.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 7, p. 557–68, jul. 2008.

SCHNEIDER, C. et al. Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. **Neuron**, v. 24, n. 4, p. 861–70, dez. 1999.

SHAH, N. M. et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 349–60, 6 maio 1994.

SHAO, M. et al. FGF8 signaling sustains progenitor status and multipotency of cranial neural crest-derived mesenchymal cells in vivo and in vitro. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 441–454, out. 2015.

STEVENTON, B.; MAYOR, R. Early neural crest induction requires an initial inhibition of Wnt signals. **Developmental Biology**, v. 365, n. 1, p. 196–207, maio 2012.

STUHLMILLER, T. J.; GARCÍA-CASTRO, M. I. Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 69, n. 22, p. 3715–37, nov. 2012.

SU, Z. et al. Sox10 regulates skin melanocyte proliferation by activating the DNA replication licensing factor MCM5. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 3, p. 216–225, mar. 2017.

TENG, L. et al. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. **Development**, v. 135, n. 9, p. 1615–1624, 26 mar. 2008.

THEVENEAU, E.; MAYOR, R. Can mesenchymal cells undergo collective cell migration? The case of the neural crest. **Cell Adhesion & Migration**, v. 5, n. 6, p. 490–498, 27 nov. 2011.

THISSE, B.; THISSE, C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. **Developmental Biology**, v. 287, n. 2, p. 390–402, 15 nov. 2005.

TRAINOR, P. A. Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. **Seminars in Cell & Developmental**

Biology, v. 16, n. 6, p. 683–93, dez. 2005.

TRENTIN, A. et al. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4495–500, 30 mar. 2004.

TSANG, M.; DAWID, I. B. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 228, p. pe17, 6 abr. 2004.

VARUM, S.; SOMMER, L. Generating melanocytes from human pluripotent stem cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 5, p. 608–610, 19 set. 2013.

VINCENT, M.; THIERY, J. P. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system. **Developmental biology**, v. 103, n. 2, p. 468–81, jun. 1984.

WONG, C. E. et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 6, p. 1005–1015, 18 dez. 2006.

ZHANG, J.-M.; HOFFMANN, R.; SIEBER-BLUM, M. Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF- β 1. **Developmental Dynamics**, v. 208, n. 3, p. 375–386, mar. 1997.