

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Raphaella Josino

**O EFEITO DE FGF8 NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS CARTILAGINOSOS A  
PARTIR DA CRISTA NEURAL TRONCAL: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN SILICO*.**

Florianópolis

2021

Raphaella Josino

**O EFEITO DE FGF8 NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS CARTILAGINOSOS A PARTIR DA CRISTA NEURAL TRONCAL: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN SILICO*.**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Josino, Raphaella

O efeito de FGF8 na formação de nódulos cartilaginosos a partir da Crista Neural Troncal: análises in vitro e in silico. / Raphaella Josino ; orientador, Giordano Wosgrau Calloni, 2021.  
109 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia celular. 3. Biologia do desenvolvimento. 4. Células da crista neural. 5. Expressão gênica. I. Wosgrau Calloni, Giordano . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Raphaella Josino

**O EFEITO DE FGF8 NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS CARTILAGINOSOS A  
PARTIR DA CRISTA NEURAL TRONCAL: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN SILICO*.**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 15 de dezembro de 2021.

---

Prof. Alexandre Verzani Nogueira, Dr.  
Diretor do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Giordano Wosgrau Calloni, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Marco Augusto Stimamiglio, Dr.  
Avaliador  
Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/Paraná

---

Prof. José Marques de Brito Neto, Dr.  
Avaliador Suplente  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

## AGRADECIMENTOS

Quando acreditamos em algo, somos tomados por uma profunda coragem e certeza de que vivemos o que precisamos viver e estamos onde precisamos estar. Este trabalho, além de muita Biologia Celular, me ensinou que acreditar em mim mesma é meio caminho andado para quaisquer que sejam os desafios da vida e que os nossos sonhos, por mais distantes e inalcançáveis que pareçam, sempre começam com alguém que acredita neles e tem a coragem de assumir para si todos os desafios necessários para alcançá-los. Com este Trabalho de Conclusão de Curso alcanço um dos meus sonhos mais lindos: me tornar Bióloga! Revivendo na minha mente e coração estes 5 anos de faculdade, gostaria de reconhecer com imensa gratidão as pessoas que foram uma grande fonte de coragem, alegria e amor para que eu pudesse chegar até aqui.

Começo agradecendo a um exímio Cientista e Professor, Giordano. Te agradeço por toda bondade, sensibilidade, dedicação e paciência que teve comigo nestes anos de convivência. Recém chegada no seu Laboratório, me dissestes certa vez: “Menina, você tem a Ciência nas veias!”, gravei estas palavras na memória e com o passar dos anos da minha jornada com a Crista Neural, eu percebi que você sempre esteve certo, eu tenho a Ciência nas minhas veias e muito do amor que desenvolvi por ela foi observando o teu trabalho. Você me ensinou que a Ciência e a Educação têm o poder de “remover barreiras intransponíveis, salvar vidas despedaçadas, alegrar corações embrutecidos pela selvageria e pela dor, e ceifar a ignorância daqueles que não podem ler, ver ou ouvir mesmo possuindo bocas, olhos e ouvidos perfeitos”. Te agradeço por muito além de um orientador, ter sido um amigo, um conselheiro e muitas vezes um pai – disposto a ouvir, compreender e alertar. Admiro a tua história com a Ciência, o teu crescente fascínio pela Educação e me sinto honrada em ter sido a tua aluna, estando certa de que os teus ensinamentos irão repercutir na minha carreira e na minha vida por muitos anos.

Meu agradecimento se estende a todas(os) as professoras(es) e pesquisadoras(es) com quem tive a oportunidade de aprender nestes anos de graduação e por quem cultivo grande admiração e respeito: Ricardo Garcez, Rafael da Rosa, Luciane Perazzolo, Daniela De Toni, Andrea Marrero, Maria Alice, Adriana Mohr e mais recentemente, Marco Stimamiglio, Bruno Dallagiovana e Saloe Bispo. Obrigada!

Agradeço a todos os meus amigos e amigas de curso e de Laboratório – Mônica, Guilherme, Daniely e Felipe – que tornaram essa caminhada mais leve, prazerosa e divertida,

com quem compartilho o amor pela Biologia. Fernanda, a amiga do “Vamos? Vamos!”, obrigada pela sua amizade verdadeira, pelos dias compartilhados sob o mesmo teto e por sempre me fazer rir até doer a barriga. Ianka, você é a prova de que a vida sempre sabe o momento e o lugar certo de nos presentear com almas especiais, nossa amizade é um grande presente para mim. Daniely, você tem um jeito brilhante e revolucionário de ser, minha dupla oficial de trabalhos da faculdade e minha amiga do coração. Agradeço ao meu namorado e melhor amigo Gustavo, que encoraja as minhas ideias mais malucas e tem sido uma fonte inesgotável de apoio, compreensão e parceria nos últimos anos.

Imensa gratidão à minha família. Meus pais Zenaide e Hamilton, irmãos Junior e Raquel, cunhada Camila e minha pequena sobrinha Beatriz – eu amo quando as pessoas dizem que somos parecidas. Obrigada por todo o apoio nestes 5 anos de faculdade, essenciais para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são meu exemplo de bondade, honestidade, perseverança, zelo e amor.

Finalmente, gostaria de reconhecer os animais – codornas e galinhas – através dos quais realizei o meu trabalho. Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Laboratório de Plasticidade e Diferenciação de Células da Crista Neural, que se tornaram a minha segunda casa nestes anos de faculdade. Ao Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/Paraná, pelas contribuições essenciais no desenvolvimento e execução deste trabalho e ao órgão de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

*“Se és capaz de dar, segundo por segundo,  
ao minuto fatal todo valor e brilho.  
Tua é a Terra com tudo que existe no mundo,  
e – o que ainda é muito mais – és uma mulher, minha filha!”*  
- Rudyard Kipling, 1895

## RESUMO

Os animais vertebrados possuem peculiaridades que os distinguem de todos os outros, além da presença de vértebras, uma característica da grande maioria desses animais é a presença de mandíbula e maxila. Um dos fatores que permitiu essa modificação crucial, do ponto de vista evolutivo, foram as células da Crista Neural (CN), que correspondem à uma população transitória de células-tronco presentes no início do desenvolvimento embrionário. As células da CN (CCN) migram a partir das bordas dorsais do Tubo Neural (TN), e podem ser divididas a grosso modo em duas grandes populações: Crista Neural Cefálica (CNC) e Crista Neural Troncal (CNT), a depender do nível axial do embrião que se encontram no início da migração. Além de contarem com um programa genético intrínseco, a CN apresenta alta plasticidade, sendo responsiva a diversos fatores solúveis e físicos presentes no microambiente. Durante sua migração pelo corpo do embrião, as células da CN utilizam informações posicionais para escolher caminhos específicos de diferenciação. Experimentos *in vitro* que permitem oferecer diferentes microambientes às CCN são capazes de modular o aparecimento ou a proeminência de determinados tipos celulares, inclusive algumas vezes às expensas de outros. Esses microambientes representados por diferentes fatores de crescimento, citocinas, moléculas de matriz extracelular, etc, são responsáveis por modular a expressão gênica e consequentemente a diferenciação das CCN. A principal diferença entre as células da CNC e CNT são os derivados que podem originar, uma vez que diferente das células da CNC, células da CNT não possuem o potencial *in vivo* de originar derivados mesenquimais. Entretanto, algumas exceções são observadas, como a gastrália cartilaginosa de crocodilos, os fibroblastos do endoneuro de camundongos e os osteoblastos que constituem os denticulos dérmicos de raias. Nesse sentido, sabe-se que o Fator de Crescimento de Fibroblastos do tipo 8 (FGF8) é um morfógeno solúvel que está intimamente relacionado com a sobrevivência e manutenção das células da CNC durante a formação craniofacial, contribuindo para que as células adotem uma identidade ectomesenquimal. Este trabalho demonstra que o tratamento com FGF8 durante as culturas primárias aumenta o número e a frequência de aparecimento de nódulos cartilagosos a partir das células da CNT submetidas a um substrato permissivo de diferenciação durante a cultura secundária, a matriz extracelular Matrigel™. Além disso, avalia a partir de dados de sequenciamento e análise transcriptômica os efeitos que FGF8 exerce na expressão gênica das células migratórias da CNT, demonstrando a possível rede regulatória envolvida na diferenciação condrocítica e formação de cartilagem a partir das células da CNT sob tratamento com FGF8.

**Palavras chave:** cartilagem, crista neural troncal, rede regulatória, transcriptoma, sequenciamento.



## ABSTRACT

Vertebrate animals have peculiarities that distinguish them from all others, in addition to the presence of vertebrae, a characteristic of the vast majority of these animals is the presence of a mandible and maxilla. One of the factors that allowed this crucial modification, from an evolutionary point of view, were the cells of the Neural Crest (NC), which correspond to a transient population of stem cells present at the beginning of embryonic development. CN (NCC) cells migrate from the Neural Tube (NT), and can be roughly divided into two large populations: Cephalic Neural Crest (CNC) and Trunk Neural Crest (TNC), depending on the axial level of the embryo that are at the beginning of the migration. In addition to having an intrinsic genetic program, NC has high plasticity, being responsive to several soluble and physical factors present in the microenvironment. During their migration through the body of the embryo, NC cells use positional information to choose specific paths of differentiation. In vitro experiments that make it possible to offer different microenvironments to NCCs are able to modulate the appearance or prominence of certain cell types, sometimes even at the expense of others. These microenvironments, represented by different growth factors, cytokines, extracellular matrix molecules, etc., are responsible for modulating gene expression and, consequently, the differentiation of NCCs. The main difference between CNC and TNC cells is the derivatives they can originate, since unlike CNC cells, TNC cells do not have the in vivo potential to originate mesenchymal derivatives. However, some exceptions are observed, such as the cartilaginous gastralia of crocodiles, the endoneurial fibroblasts of mice and the osteoblasts that constitute the dermal denticles of rays. In this sense, it is known that Fibroblast Growth Factor type 8 (FGF8) is a soluble morphogen that is closely related to the survival and maintenance of CNC cells during craniofacial formation, contributing to the cells adopting an ectomesenchymal identity. This work demonstrates that FGF8 treatment during primary cultures increases the number and frequency of appearance of cartilaginous nodules from TNC cells subjected to a permissive substrate of differentiation during secondary culture, the extracellular matrix Matrigel™. In addition, it evaluates from sequencing data and transcriptomic analysis the effects that FGF8 exerts on the gene expression of migrating TNC cells, demonstrating the possible regulatory network involved in chondrocytic differentiation and cartilage formation from TNC cells under treatment with FGF8.

**Key words:** cartilage, trunk neural crest, regulatory network, transcriptome, sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Passos do desenvolvimento embrionário que levam à formação da Crista Neural. ....	19
Figura 2 - Tipos celulares originados a partir da Crista Neural. ....	21
Figura 3 - Mapa de destino das células da Crista Neural. ....	22
Figura 4 - Divisão básica: crista neural cefálica e crista neural troncal. ....	23
Figura 5 - Padrão de expressão dos genes <i>Hox</i> no embrião em desenvolvimento de codorna e galinha. ....	24
Figura 6 - Representação do potencial vs. destino das células da Crista Neural. ....	32
Figura 7 - Da sinalização à transcrição gênica. ....	34
Figura 8 - Primeira rede gênica regulatória da CN publicada na literatura. ....	36
Figura 9 - Visão de cascata de sinalização vs. arquitetura "hub-and-spoke" de sinalização. ....	37
Figura 10 - FGF8 e Shh agem sinergicamente para promover a diferenciação mesenquimal a partir das células da CNC. ....	39
Figura 11 - Fluxograma resumindo as atividades desenvolvidas neste trabalho. ....	46
Figura 12 - Esquema representativo da metodologia referente à primeira etapa do trabalho. ....	48
Figura 13 - Esquema representativo da metodologia referente à segunda etapa do trabalho. ....	51
Figura 14 - Nódulos de cartilagem obtidos a partir da Crista Neural Troncal. ....	54
Figura 15 - Influência do tratamento de FGF8 na formação de nódulos de cartilagem a partir das células da Crista Neural Troncal. ....	55
Figura 16 - Influência do tratamento de FGF8 na frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem a partir das células da Crista Neural Troncal. ....	57
Figura 17 - Número de frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem a partir de células da CNT tratadas ou não com FGF8 durante as culturas primárias. ....	59
Figura 18 - Análise de expressão de genes de Borda de Placa Neural e especificadores de CN em células tratadas ou não com FGF8. ....	61
Figura 19 - Análise de expressão de genes de CN migratória em células tratadas ou não com FGF8. ....	62

Figura 20 - Análise de expressão de genes de diferenciação condrocítica em células tratadas ou não com FGF8.....	63
Figura 21 - Análise de mapa de calor da expressão diferencial entre células tratadas ou não tratadas com FGF8.....	65
Figura 22 - Expressão de genes acompanhando os diversos passos do desenvolvimento das células da Crista Neural Troncal sob tratamento com FGF8. ....	67
Figura 23 - Efeito da sinalização de FGF8 <i>in vivo</i> - CNC e <i>in vitro</i> - CNT.....	71
Figura 24 - Circuito de especificação da CNT em células tratadas com FGF8. ....	76
Figura 25 - Circuito de migração da CNT em células tratadas com FGF8. ....	81
Figura 26 - Circuito de diferenciação condrocítica da CNT em células tratadas com FGF8.....	88
Figura 27 - Rede gênica regulatória que controla a diferenciação condrocítica em células da Crista Neural Troncal tratadas com FGF8.....	98

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Termos utilizados para realizar as buscas bibliográficas

Tabela 2 – Categorias de genes validados na literatura

Tabela 3 - Bibliografia utilizada na construção das relações na rede gênica regulatória.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS \*

<b>3T3</b>	Linhagem de fibroblastos embrionários
<b>AB1</b>	Arco branquial 1
<b>AB2</b>	Arco branquial 2
<b>AB3</b>	Arco branquial 3
<b>AB4</b>	Arco branquial 4
<b>Alp</b>	Alkaline Phosphatase (Fosfatase Alcalina)
<b>Ap2</b>	Transcription Factor AP-2 (Fator de Transcrição AP2)
<b>BMP2</b>	Bone Morphogenetic Protein 2 (Proteína Morfogenética do Osso 2)
<b>BMPs</b>	Bone Morphogenetic Proteins (Proteínas Morfogenéticas do Osso)
<b>Cad11</b>	Caderina 11
<b>Cad7</b>	Caderina 7
<b>cDNA</b>	DNA Complementar
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CN</b>	Crista Neural
<b>CNC</b>	Crista Neural Cefálica
<b>CNT</b>	Crista Neural Troncal
<b>CO2</b>	Gás carbônico
<b>Col I</b>	Colágeno do tipo 1
<b>Col II</b>	Colágeno do tipo II
<b>DspP</b>	Dentin Sialophosphoprotein (Sialofosfoproteína Dentina)
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
<b>ERK</b>	Extracellular Receptor Kinase (Receptor Extracelular Ativado por Quinase)
<b>Ets1</b>	Fator de Transcrição 1 da Família ETS
<b>FGF2</b>	Fibroblast Growth Factor 2 (Fator de Crescimento de Fibroblastos 2)
<b>FGF8</b>	Fibroblast Growth Factor 8 (Fator de Crescimento de Fibroblastos 8)
<b>FGFs</b>	Fibroblast Growth Factors (Fatores de Crescimento de Fibroblastos)
<b>FoxD3</b>	Forkhead Box D3
<b>Hes4</b>	Transcription Factor HES-4 (Fator de Transcrição HES4)

<b>HNK1</b>	Human Natural Killer 1 (Célula Natural Killer Humana 1)
<b>Hox</b>	Homeobox (Gene Homeótico)
<b>Hox9</b>	Homeobox 9 (Gene Homeótico 9)
<b>HoxA2</b>	Homeobox A2 (Gene Homeótico A2)
<b>HoxA3</b>	Homeobox A3 (Gene Homeótico A3)
<b>HoxB1</b>	Homeobox B1 (Gene Homeótico B1)
<b>HoxB4</b>	Homeobox B4 (Gene Homeótico B4)
<b>HoxC4</b>	Homeobox C4 (Gene Homeótico C4)
<b>HoxC6</b>	Homeobox C6 (Gene Homeótico C6)
<b>HoxD4</b>	Homeobox D4 (Gene Homeótico D4)
<b>Id2</b>	Inhibitor Of DNA Binding 2 (Inibidor de Ligação ao DNA 2)
<b>Lhx8</b>	LIM/Homeobox Protein Lhx8 (Proteína LIM/Gene Homeótico Lhx8)
<b>Lmo4</b>	Lim Domain Only 4 (Domínio Lim 2)
<b>lncRNA</b>	Long non-coding RNA (RNA Longo não-codificante)
<b>Ltk</b>	Leukocyte Receptor Tyrosine Kinase (Receptor de Tirosina Quinase de Leucócito)
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno)
<b>MAPKK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (Proteína Quinase-quinase Ativada por Mitógeno)
<b>MAPKKK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (Proteína Quinase-quinase-quinase Ativada por Mitógeno)
<b>MDF</b>	Meio de Diferenciação Mesenquimal
<b>mRNA</b>	RNA Mensageiro
<b>Msx1</b>	Homeobox Msx1 (Gene Homeótico Msx1)
<b>Msx2</b>	Homeobox Msx2 (Gene Homeótico Msx2)
<b>Myb</b>	Fator de Transcrição da Família MYB
<b>Ncad</b>	N-caderina
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
<b>Noelin 1</b>	Noelina 1
<b>Pax3</b>	Paired Box 3
<b>Pax7</b>	Paired Box 7

<b>PCR</b>	Polimerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>R4</b>	Rombômero 4
<b>Runx2</b>	Runt Related Transcription Factor 2 (Fator de Crescimento Relacionado à Execução 2)
<b>RxrG</b>	Retinoid X Receptor Gama (Receptor Gama de Retinóide X)
<b>Sox10</b>	SRY-Box Transcription Factor 10 (Fator de Transcrição SRY-Box 10)
<b>Sox10E2</b>	SRY-Box Transcription Factor 10E2 (Fator de Transcrição SRY-Box 10E2)
<b>Sox9</b>	SRY-Box Transcription Factor 9 (Fator de Transcrição SRY-Box 9)
<b>sRNA</b>	Small RNA (RNA pequeno)
<b>Suv39h1</b>	Histone-Lysine N-Methyltransferase SUV39H1 (Histona-lisina N-metiltransferase Suv39h1)
<b>TEM</b>	Transição Epitélio-Mesenquimal
<b>Tfap2a</b>	Transcription Factor AP-2 Alpha (Fator de Transcrição AP2 Alfa)
<b>Tfap2b</b>	Transcription Factor AP-2 Beta (Fator de Transcrição AP2 Beta)
<b>TN</b>	Tubo Neural
<b>TUNEL</b>	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling (Marcação de 'Nicks' por dUTP e Deoxinucleotidil Terminal Transferase)
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>Zic1</b>	Zic Family Member 1 (Membro 1 da Família Zic)
<b><math>\alpha</math> Mem-Gibco</b>	Minimum Essential Medium Alpha Medium

\* Para nomear genes e proteínas, adotamos a regra de nomenclatura utilizada classicamente em publicações científicas. Nomes de genes recebem a grafia em itálico enquanto proteínas recebem a grafia regular. Nomes de genes e proteínas são escritos em caixa alta no caso de nos referirmos a genes e proteínas humanas, caso contrário, apenas a primeira letra do nome estará escrita com letra maiúscula.

## LISTA DE SÍMBOLOS

™	Trade Mark (Marca Comercial)
®	Marca Registrada



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	A CRISTA NEURAL E SUA FORMAÇÃO.....	18
1.2	MICROAMBIENTE E EXPRESSÃO DE GENES HOX.....	22
1.3	O POTENCIAL CONDRÓGÊNICO DA CRISTA NEURAL TRONCAL.....	25
1.4	REDES DE REGULAÇÃO GÊNICA DA CRISTA NEURAL.....	32
1.5	A RELAÇÃO ENTRE FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS TIPO 8 (FGF8) E A CONDRÓGÊNESE NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL.....	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	ETAPA 1 – OBTENÇÃO DE CARTILAGEM A PARTIR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL.....	46
4.1.1	<b>CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL</b>	<b>46</b>
4.1.2	<b>CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL.....</b>	<b>47</b>
4.1.3	<b>IDENTIFICAÇÃO DOS NÓDULOS DE CARTILAGEM.....</b>	<b>47</b>
4.1.4	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>49</b>
4.2	ETAPA 2 – SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL.....	49
4.2.1	<b>PREPARO PARA ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA.....</b>	<b>49</b>
4.2.2	<b>EXTRAÇÃO DO RNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO TRANSCRIPTOMA.....</b>	<b>49</b>
4.2.3	<b>IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES CANDIDATOS.....</b>	<b>51</b>

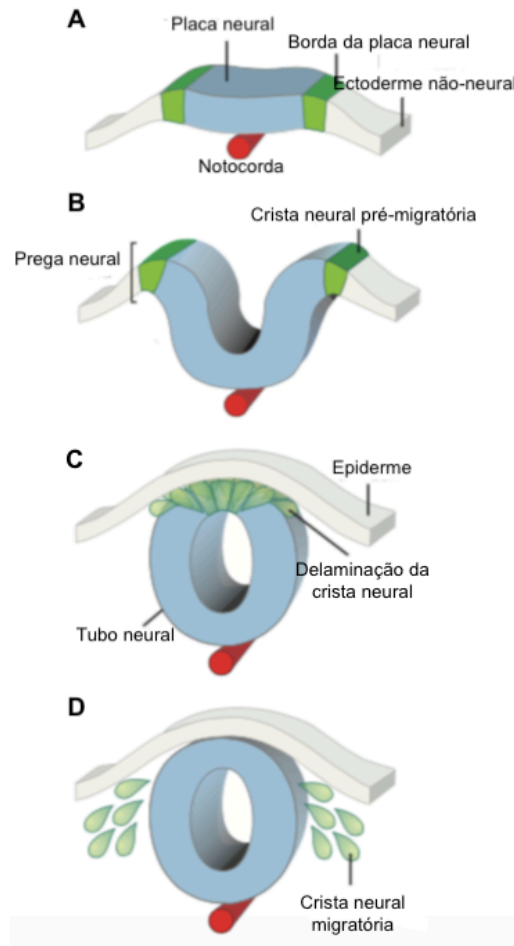
4.2.4	CONSTRUÇÃO DA BASE DE DADOS .....	52
4.2.5	ANÁLISE DAS REDES REGULATÓRIAS.....	52
5	RESULTADOS .....	54
5.1	O TRATAMENTO COM FGF8 EM CULTURAS PRIMÁRIAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL (CNT) PROMOVE UM AUMENTO NA OBTENÇÃO DE CONDRÓCITOS EM CULTURAS SECUNDÁRIAS DA CNT.....	54
5.2	O TRATAMENTO COM FGF8 FAVORECE A EXPRESSÃO DE GENES PRÓ-CARTILAGEM NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL.....	60
6	DISCUSSÃO .....	66
6.1	FGF8 MANTÉM A MULTIPOTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL .....	67
6.2	GENES DE BORDA DE PLACA NEURAL E ESPECIFICADORES DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8 .....	72
6.3	DELAMINAÇÃO E MIGRAÇÃO DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8 .....	76
6.4	MÓDULO DE DIFERENCIAÇÃO CONDROCÍTICA DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8 .....	81
6.5	GENES HOX.....	88
6.6	FGF8 DESPERTA O POTENCIAL ANCESTRAL DA CRISTA NEURAL NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL .....	91
7	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

## 1. 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A CRISTA NEURAL E SUA FORMAÇÃO

A crista neural (CN) corresponde a uma população transitória de células migratórias e multipotentes que surgem durante a fase embrionária conhecida como neurulação. Durante o desenvolvimento dos animais vertebrados, o folheto germinativo ectoderme sofre de forma progressiva uma série de modificações que serão essenciais para a formação de tecidos e surgimento de células, incluindo a CN. Durante o estágio de gástrula e nêurula, a ectoderme se organiza originando a placa neural, que posteriormente – na fase de nêurula – irá sofrer uma dobra em formato de U para que seja formado o tubo neural (TN) (BRONNER-FRASER, 1994) (Figura 1A-B). A região da ectoderme que se transforma em placa neural é conhecida como ectoderme neural, enquanto que a ectoderme que não forma a placa neural é conhecida como ectoderme não neural (MAYOR; THEVENEAU, 2012). No limiar entre essas duas regiões, encontra-se a borda da placa neural (BPN), que com os movimentos morfogenéticos do TN, irão alcançar os ápices da borda do TN (Figura 1B-C). Estas células apicais irão sofrer um processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM), que irá garantir a capacidade migratória e assim, elas deixam o TN e migram extensivamente, invadindo todo o corpo do embrião em desenvolvimento (KEROSUO; BRONNER-FRASER, 2012). Essas células migratórias que saem dos ápices das bordas do TN são, portanto, as células da CN (BAKER; BRONNER-FRASER, 1997) (Figura 1C-D).

Figura 1 - Passos do desenvolvimento embrionário que levam à formação da Crista Neural.



Formação da CN. (A) Especificação da borda da placa neural, localizada entre a ectoderme neural e a ectoderme não neural; (B) Movimentações na placa neural originam o TN e no ápice deste, acontece a especificação das células da CN; (C) Com o TN fechado, as células da CN sofrem a transição epitélio-mesenquimal e delaminam a partir do TN; (D) Finalmente, as células da CN adotam seus diferentes caminhos migratórios, dando origem a diversos tipos celulares. Fonte: Adaptado de SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015.

As células da CN foram observadas e relatadas pela primeira vez em embriões de aves há cerca de 150 anos atrás, pelo embriologista suíço Wilhelm His, que as observou examinando a região dorsal de um embrião e as descreveu como um grupo de células que migram entre o dorso do TN e o epitélio. His nomeou essa região de linha intermediária – em seu idioma,

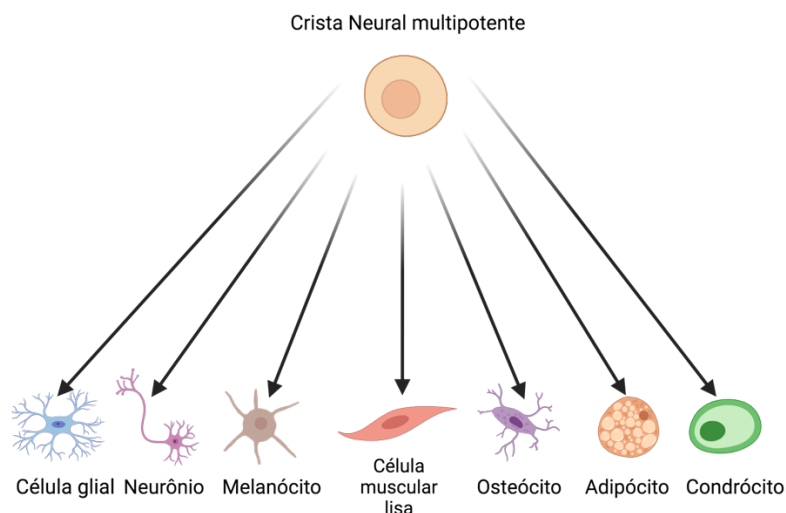
*Zwischenstrang* – e sugeriu através de seus estudos, que estas células seriam a fonte dos gânglios periféricos (LE DOUARIN, 2004; WESTON; THIERY, 2015). O nome “Crista Neural” veio a surgir somente uma década depois, quando Arthur Milnes Marshall descreveu esta população de células como um “crescimento” de células formadas através da fusão dos cumes do TN (que ele denominou canal neural). Marshall era professor de Zoologia no Owens College em Manchester, onde permaneceu até a sua morte aos 41 anos, devido a uma queda do pico mais alto da Inglaterra durante uma atividade de escalada (WESTON; THIERY, 2015).

Nesta mesma época, a mesoderme, tecido embrionário característico dos animais triblásticos, era considerada a única fonte de tecidos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário, sendo creditado à CN apenas a origem dos gânglios e neurônios periféricos. Essa história estava prestes a mudar quando Julia Platt, em 1893 com o uso de embriões de anfíbios da espécie *Necturus maculosus*, declarou perante à comunidade científica que a cartilagem craniofacial e os odontoblastos eram originados a partir da CN. Para diferenciar os derivados da mesoderme e da ectoderme, Platt cunhou o termo mesectoderme, utilizado até os dias atuais (HALL, 2008). Apesar de ser apoiada por inúmeros pesquisadores contemporâneos, na época sua declaração foi de certa forma polêmica e suscitou muitas controvérsias, contrapondo a teoria das camadas germinativas, que estabelecia o surgimento dos tecidos mesodérmicos apenas a partir da mesoderme, como o próprio nome sugere (OPPENHEIMER; HAMBURGUER, 1940). Além disso, a comunidade científica da época era majoritariamente composta por homens e as mulheres ainda não haviam alcançado seu espaço na Ciência e, por isso, entravam em descrédito muito rápida e arbitrariamente. As conclusões de Platt foram tão polêmicas, que demorou cerca de 40 anos para que pesquisadores independentes voltassem a “tocar no assunto” e começassem a demonstrar o potencial mesenquimal da CN (HALL, 2008). Assim, quase no final de sua vida, Julia Platt assistiu a comunidade científica assumir o que ela havia proposto: A CN corresponde à principal fonte de mesênquima, tecido conjuntivo e cartilagem da face dos animais vertebrados. Hoje em dia, a capacidade da CN em formar derivados mesectodermiais além de ter sido documentada em todas as classes de vertebrados, ocupa uma posição central nos estudos de desenvolvimento e evolução dos vertebrados, começando com o estudo pioneiro de Gans e Northcutt (1983), que relaciona o surgimento da CN com o desenvolvimento do estilo de vida predatório dos vertebrados (GANS; NORTHCUTT, 1983).

Após a delaminação, as células da CN migram extensivamente através de rotas definidas para praticamente todas as regiões do corpo do embrião em desenvolvimento, onde são capazes

de sofrer a diferenciação em uma miríade de tipos celulares (Figura 2). Assim, estas células configuram-se como progenitores altamente multipotentes tanto *in vivo* como *in vitro*, alguns dentre eles com demonstrada capacidade de autorrenovação *in vitro* (BAGGIOLINI et al., 2015; TRENTIN et al., 2004).

Figura 2 - Tipos celulares originados a partir da Crista Neural.

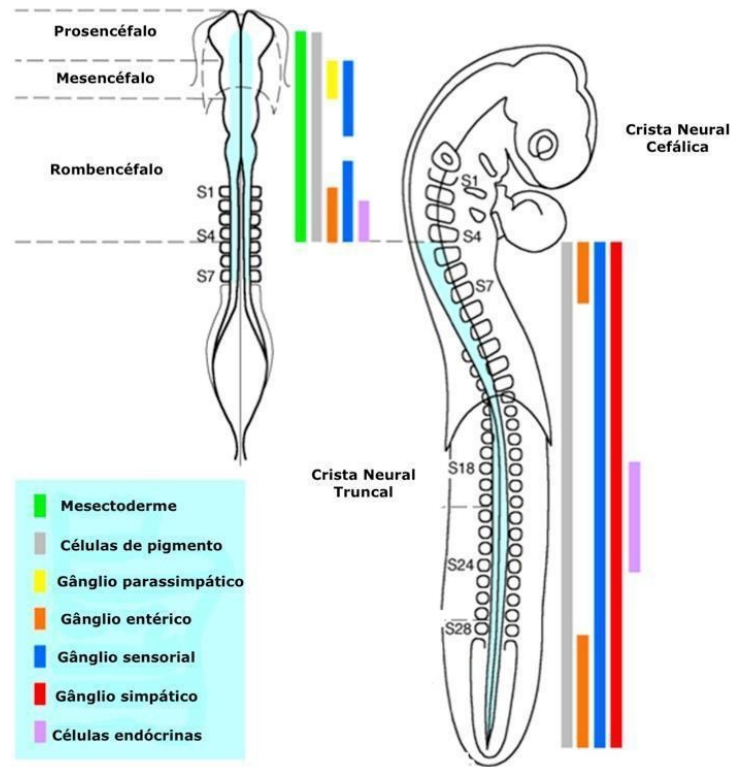


Representação ilustrando de forma básica os tipos celulares que as células da CN são capazes de originar: células da glia, neurônios, melanócitos, células de músculo liso, condrócitos, osteócitos e adipócitos. Fonte: Própria autora.

Durante a migração, as células da CN entram em contato com uma variedade imensurável de fatores solúveis (*i.e.* fatores de crescimento) e não solúveis (*i.e.* matriz extracelular) que estão presentes ao longo do ambiente migratório. Muitos desses elementos atuam como moléculas sinalizadoras. Os sinais destas moléculas são capazes de influenciar a expressão genética e epigenética das células, através da ativação e inibição de determinados genes (HACKLAND *et al.*, 2019; SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015).

Além do microambiente, o nível axial de onde a célula emigra pode influenciar no destino de diferenciação tomado pelas células da CN *in vivo*. Dessa forma, existem derivados formados por células da CN que emigram de todos os níveis axiais do embrião, como as células de pigmento, enquanto isso, outros derivados estão restritos a níveis específicos, como os derivados da mesectoderme (DUPIN; LE DOUARIN, 2014) (Figura 3).

Figura 3 - Mapa de destino das células da Crista Neural.

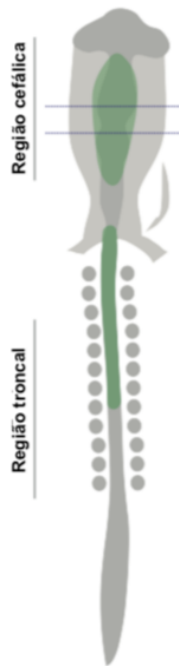


Os derivados da CN variam ao longo do eixo ântero-posterior do TN *in vivo*. As células de pigmento – representadas pela linha cinza – derivam de todos os níveis ao longo do eixo, entretanto, existem tipos celulares restritos a áreas específicas, como os gânglios, as células endócrinas e os derivados mesenquimais – representados pelas linhas coloridas. Fonte: Adaptado de LE DOUARIN; DUPIN, 2014.

## 1.2 MICROAMBIENTE E EXPRESSÃO DE GENES HOX

Dependendo da região axial da qual as células da CN emigram, podem ser subdivididas em quatro regiões anatômicas principais, sendo elas a região cefálica (que abrange a CN cardíaca), troncal e vagal, esta última sendo também conhecida como região sacral (TRAINOR, 2005). Para os propósitos concernentes a este trabalho, nos concentraremos nas diferenças entre as duas principais regiões: crista neural cefálica (CNC) e crista neural troncal (CNT) (Figura 4).

Figura 4 - Divisão básica: crista neural cefálica e crista neural troncal.



Representação da divisão das principais regiões anatômicas do embrião. Basicamente, as células da CN podem ser divididas em duas grandes subpopulações: crista neural cefálica e crista neural troncal. Fonte: Adaptado de (SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015).

As células da CNC emergem a partir da região mais anterior do embrião que se localiza do prosencéfalo ao quarto par de somitos. Estas dão origem à maior parte da estrutura craniofacial dos vertebrados, sendo capazes de sofrer a diferenciação em células de cartilagem, osso, gordura e músculo liso (CREUZET; COULY; LE DOUARIN, 2005). Já as células da CNT emergem a partir do limite entre o quarto e o quinto par de somitos e estendem-se até o vigésimo oitavo par. Portanto, migram a partir da região mais posterior do embrião originando neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, além dos melanócitos e das células adrenomedulares. Importante pontuar que é restrita à estas células a capacidade de originar derivativos mesenquimais *in vivo* (CREUZET; COULY; LE DOUARIN, 2005).

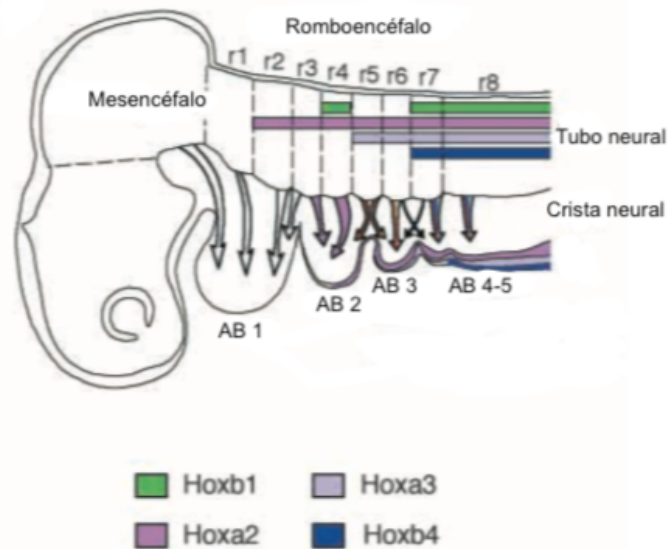
Conforme comentado anteriormente, o microambiente é a principal influência exercida sobre as células multipotentes para que possam gerar determinados tipos celulares às expensas de outros. No entanto, a expressão de genes restritos à determinadas regiões também influencia a diferenciação celular *in vivo*. Quando se trata de CNC e CNT, um claro exemplo disto é a presença – ou ausência – da assinatura de genes *Hox*, que exibem domínios de expressão



diferencial ao longo do eixo ântero-posterior do embrião, funcionando como especificadores-chave da identidade regional das células (PARKER; PUSHEL; KRUMLAUF, 2018).

Nos animais vertebrados, diversas estruturas, incluindo partes da face, se desenvolvem a partir de pequenos primórdios compostos por células mesenquimais indiferenciadas cobertas por epitélio. Um desses primórdios é o primeiro arco branquial (AB1). As células da CNC que migram para o AB1 são completamente *Hox*-negativas e por isso são capazes de se desenvolver em dentes, elementos esqueléticos da mandíbula, parede lateral do crânio e orelha média. Já as células da CNC que colonizam o segundo arco branquial em diante são em sua maioria *Hox*-positivas (COULY et al., 1998) (Figura 5). Esse balanço da expressão dos genes *Hox* é indispensável para a correta padronização do eixo corporal do embrião, de forma que se perturbada (em experimentos de perda ou ganho de expressão), a formação dos elementos esqueléticos do embrião é severamente afetada (COULY et al., 1998).

Figura 5 - Padrão de expressão dos genes *Hox* no embrião em desenvolvimento de codorna e galinha.



Representação da expressão dos genes *Hox* no dia embrionário 3. As flechas representam a direção de migração das células da CNC. Na região anterior é possível observar que as células migram para o primeiro AB (AB1) sem qualquer expressão de *Hox*. No segundo rombômero inicia-se a expressão de *HoxA2*, gene muito importante para que seja formada a cartilagem hióide a partir das células da CN que migram para o segundo AB (AB2). Posteriormente, *HoxB1*, *HoxA3* e *HoxB4* começam a ser expressos. Fonte: Adaptado de (CREUZET et al., 2002).

### 1.3 O POTENCIAL CONDRÓGÊNICO DA CRISTA NEURAL TRONCAL

A primeira observação de células mesenquimais derivadas da CN foi feita em 1888 por Katschenko. Mais tarde em 1893, o termo “mesectoderme” foi cunhado por Julia Platt, após observar que células do folheto germinativo ectoderme possuíam capacidade de gerar derivados mesenquimais (LE DOUARIN; DUPIN, 1993), inclusive mais tarde foi proposto perante à comunidade científica que a mesectoderme deveria ser considerada como um quarto folheto embrionário, classificando os animais vertebrados como quadriblásticos em vez de triblásticos, postura classicamente adotada (HALL, 2000).

Primeiramente, é importante lembrar que as células da CNC ao saírem do tubo neural, se direcionam aos arcos branquiais, onde irão contribuir com a formação da grande maioria dos ossos, tecidos conectivos e nervos da cabeça (LABONNE; BRONNER-FRASER, 1998; MINOUX; RIJLI, 2010). A formação dos derivados cartilagosos e ósseos da face acontecem a partir do primeiro arco branquial, onde as células se deparam com uma série de fatores importantes para que possam sofrer a diferenciação nesses derivativos e principalmente, encontram um ambiente livre de genes *Hox*, cuja expressão deve ser nula para que processos como a condrogênese possam ocorrer (PARKER; PUSHHEL; KRUMLAUF, 2018).

Os estudos que demonstram a diferenciação mesenquimal a partir das células da CN *in vivo* foram feitos utilizando a CNC, ao mesmo tempo, diversos trabalhos clássicos na literatura demonstram que a CNT não possui a potencialidade de gerar derivados mesenquimais como células de cartilagem e osso, sendo esta capacidade de diferenciação exclusiva de células da CNC (LE DOUARIN; LÈ LIEVRE, 1977; NODEN, 1978; NAKAMURA; LE LIÈVRE, 1982). Os experimentos destes trabalhos clássicos foram refeitos depois de mais de duas décadas pelo grupo de pesquisa de Marianne Bronner. Com o emprego de técnicas de marcação celular mais avançadas, o grupo realizou experimentos de transplante da CNT diretamente na região cefálica, visando entender se a dificuldade da CNT em gerar derivados mesenquimais *in vivo* está unicamente relacionada com o ambiente não permissivo que essas células encontram ao migrar pelo embrião. Além disso, o grupo isolou a parte dorsal dos tubos neurais tanto da região troncal quanto cefálica de codornas e procedeu com o transplante diretamente no primeiro arco branquial de galinhas. As células da CN que migraram a partir dos explantes do

TN retirado da região cefálica povoaram a maior parte dos processos mandibulares, contribuindo com a formação da cartilagem de Meckel. Já as células provenientes do TN troncal, apesar de terem migrado para a estrutura cartilaginosa de Meckel não contribuíram com condrócitos no local. Finalmente, estes pesquisadores obtiveram os mesmos resultados observados nos trabalhos clássicos mencionados anteriormente, demonstrando que de fato, a CNT não possui a capacidade de originar derivados cartilagosos *in vivo* (LWIGALE; CONRAD; BRONNER-FRASER, 2004).

De fato, as pistas presentes *in vivo* não são suficientes para a indução de cartilagem a partir da CNT na grande maioria dos vertebrados, no entanto, uma revisão recente realizada por uma das integrantes de nosso grupo de pesquisa, reúne uma série de publicações que documentam a existência do potencial mesenquimal e/ou esqueletogênico da CNT a partir dos grandes grupos animais como peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (RODRIGUES-DASILVA, 2021). Além disso, trabalhos realizados *in vitro* demonstram que essas células possuem a potencialidade de gerar derivados mesenquimais desde que sejam estimuladas de forma adequada, com a utilização de influências químicas, como a adição de hormônios, fatores de crescimento ou morfógenos no meio de cultivo básico das células, ou físicas, com a presença da matriz extracelular. Além disso, nosso grupo hipotetiza que o processo de mecanotransdução pode mudar a transcrição gênica, em respostas às forças físicas exercidas pelo ambiente no qual as células entram em contato (MCGONNELL; GRAHAM; 2002; ABZHANOV *et al.*, 2003; ITO; IDO, 2006; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013; RAMOS-HRYB *et al.*, 2013; TAUFER; RODRIGUES-DASILVA; CALLONI, 2020).

Culturas da CNT de embriões de galinha embebidas em meio de cultivo incluindo dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato (meio comumente utilizado para a obtenção de condrócitos e osteócitos) são capazes de dar origem a derivados cartilagosos em culturas de longo prazo, cultivadas durante 4 a 5 semanas (MCGONNELL; GRAHAM, 2002). Os resultados demonstram que entre a segunda e terceira semana, as células da CNT começam a expressar marcadores de condrócitos, como *ColIII*, e após a terceira semana constatou-se a expressão de *Runx2*, um marcador extremamente necessário para a osteogênese (MCGONNELL; GRAHAM, 2002). Os autores demonstraram ainda a importância do microambiente *in vivo* para que a diferenciação condrocítica seja alcançada pelas células da CNT, procedendo com o implante de agregados celulares da CNT de codorna diretamente no primórdio maxilar e mandibular de embriões de galinha no estágio Hamburger-Hamilton (HH)

14, onde foram mantidos e analisados quando o embrião atingiu o estágio de desenvolvimento HH 36. A análise das células da CNT providas do embrião de codorna – evidenciada através de um anticorpo específico para células destes animais – demonstrou que essas células se espalharam por grande parte do território facial do hospedeiro e contribuíram com a formação de alguns elementos esqueléticos da face como a cartilagem de Meckel e a cartilagem escleral, presente ao redor dos olhos (MCGONNELL; GRAHAM, 2002). Assim, este trabalho demonstrou de forma pioneira que a CNT é passível de condrogênese quando na presença de fatores que a induzem para tal e gerou uma série de rumores e críticas na época em que foi publicado, uma vez que classicamente, essas células não eram dotadas de tal potencialidade. Ao mesmo tempo, abriu as portas para um novo universo de pesquisa em torno do potencial esqueletogênico das células da CNT, fascinando pesquisadores de locais e gerações muito distantes, inclusive esta que vos escreve.

Utilizando o mesmo modelo animal, no ano seguinte Abzhanov e colaboradores (2003) publicaram um trabalho mostrando que entre o décimo segundo e décimo quinto dia, é possível observar a formação de condrócitos nas culturas da CNT. Segundo os autores, com o passar dos dias de cultivo, a CNT perde a sua especificidade e passa a se comportar de forma mais semelhante à CNC, passando a expressar *Id2* e *Noelin1*, marcadores de CNC e perdendo a expressão de genes *Hox*, resultando na condrogênese a partir da CNT (ABZHANOV et al., 2003). Ainda, a formação de nódulos cartilagosos sofre uma redução quando as células da CNC são transplantadas para um ambiente “*Hox* positivo”, por isso, nas culturas de CNT a condrogênese se dá apenas após um longo período de cultivo, respeitando o tempo necessário para que as células da CNT possam perder a sua assinatura de *Hox* e assim, serem capazes de sofrer a diferenciação em derivados cartilagosos (ABZHANOV et al., 2003).

Com o fim de confirmar se os resultados se repetiam com a utilização de um modelo animal diferente, a CNT de camundongos foi submetida ao tratamento com FGF2 com o intuito de obter nódulos de cartilagem nas culturas de células (ITO; IDO, 2006). Depois de 5 dias em cultivo, foram observados remanescentes de nódulos de cartilagem, marcados com Azul de Alcian e ColIII, ambos marcadores de condrócitos. Os autores observaram que nos primeiros dias de tratamento a expressão de *Hox9* diminuiu enquanto que a expressão de *Id2*, um marcador clássico da CNC, aumentou. Entretanto, com o passar dos dias de cultivo, a expressão de ambos os genes se tornou similar à expressão observada em células não tratadas e, para isso, propõe-se duas explicações plausíveis: A primeira é que a CNT pode perder rapidamente o seu

potencial condrogênico *in vitro* e a segunda, que a CNT pode expressar este potencial sob efeito de FGF2 e independentemente da regulação negativa de *Hox9* e positiva de *Id2* (ITO; IDO, 2006).

Além de fatores solúveis adicionados ao meio de cultivo, existem trabalhos que demonstram a importância do substrato para a diferenciação condrocítica a partir das células da CNT. Utilizando células da CNT obtidas a partir da região dos últimos 10 somitos de embriões de codorna no estágio de desenvolvimento de 20 a 25 somitos, sem a adição de fatores específicos para propiciar a condrogênese, Calloni (2007) observou a diferenciação condrocítica a partir do oitavo dia de cultivo em células da CNT semeadas em massa (800 células por poço) ou clonalmente (uma única célula por poço) sobre monocamadas densas de 3T3, uma linhagem celular de fibroblastos de camundongo com a proliferação celular inibida. Adicionalmente, neste trabalho fez-se útil o emprego do morfógeno Sonic Hedgehog (Shh), que aumentou consideravelmente a frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem nos poços de cultivo. Como novidade, foi demonstrado em culturas clonais um progenitor multipotente da CNT capaz de originar células da glia, células de músculo liso e condrócitos (CALLONI *et al.*, 2007).

Continuando a busca por progenitores mesenquimais obtidos a partir de células da CNT, Coelho-Aguiar e colaboradores (2013) realizaram culturas de massa e clonais de embriões de codorna no estágio de desenvolvimento de 18 a 25 somitos. As células da CNT foram retiradas a partir da região dos últimos 10 somitos do embrião. Neste trabalho foram utilizados dois coquetéis diferentes para estimular a diferenciação mesenquimal. Um deles para propiciar a diferenciação adipogênica (insulina, tri-iodo-tironina e rosiglitazona) e o outro para a obtenção de osteócitos (dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerol fosfato). Os coquetéis de diferenciação mesenquimal foram incorporados ao meio de cultivo a partir do sétimo dia da cultura celular, sendo este tratamento eficiente em promover a diferenciação osteogênica e adipogênica tanto nas culturas de massa, quanto nas culturas clonais. As culturas clonais foram realizadas em placas revestidas por colágeno do tipo I (para obtenção de adipócitos) e revestidas por 3T3 para analisar a diferenciação em condrócitos e osteócitos. A diferenciação condrogênica, que nos interessa no momento, foi obtida tanto a partir de células tratadas com o coquetel de diferenciação, quanto em células não tratadas. No entanto, somente na condição tratada foi possível verificar a presença de mineralização, indicando a ocorrência de ossificação endocondral, que ocorre a partir da matriz cartilaginosa. Já a diferenciação adipocítica mostrou-

se exclusivamente sob tratamento com o coquetel de diferenciação (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013).

Grande parte de todo o conhecimento científico que se tem até o momento sobre as capacidades de diferenciação das células da CNC e CNT foram realizados com a utilização de substratos bidimensionais (2D) cobertos ou não com moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno, laminina, etc. (COSTA-SILVA *et al.*, 2009; ITO; MORITA; SIEBER-BLUM, 1993; TRENTIN *et al.*, 2004). Além disso, também foi utilizado como substrato o 3T3, uma linhagem de fibroblastos de camundongo que permitiu descobertas incríveis acerca da multipotencialidade das células da CNT, permitindo o aparecimento de praticamente todos os seus derivados, até mesmo os tipos celulares de obtenção mais laboriosa, como neurônios e condrócitos (DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010). No entanto, a utilização de 3T3 como substrato implica na presença de fatores de crescimento no meio de cultivo que são secretados pelos fibroblastos e, assim, não é possível ter um controle total sobre os processos que acontecem durante a diferenciação das células da CNT. Outro dos inconvenientes destes substratos é a impossibilidade de criar um ambiente tridimensional (3D) para que as células possam desenvolver seu pleno potencial, uma vez que um ambiente 3D é mais próximo das condições que estas células experimentam *in vivo*. Grande parte dos trabalhos com cultivo celular, não apenas das células da CN, foram e são realizados sobre um ambiente 2D, no entanto, existem trabalhos que demonstram que o ambiente 3D é o mais propício para que as células possam refletir seu comportamento tal qual dentro do corpo do embrião, e, com isso, desenvolverem de forma mais plena as suas potencialidades (BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005).

O trabalho realizado por Ramos-Hryb e colaboradores (2013) demonstra de forma muito interessante a importância deste ambiente tridimensional para a diferenciação da CN utilizando Matrigel<sup>TM</sup> como substrato. O Matrigel<sup>TM</sup> é uma matriz extracelular obtida da membrana basal de sarcoma de ratos que conta com a presença de uma série de proteínas e fatores de crescimento em diferentes concentrações, sendo muito utilizado em estudos de diferenciação e crescimento celular, bem como em experimentos que visam avaliar a adesão e a morfogênese das células (KLEINMAN; MARTIN, 2005). No poço de cultivo, Matrigel<sup>TM</sup> é capaz de promover um ambiente 2D, localizado mais centralmente e um ambiente 3D na periferia dos poços. Ramos-Hryb e colaboradores (2013) demonstraram que o revestimento da placa com Matrigel<sup>TM</sup> é capaz de suportar além da diferenciação condrocítica, a diferenciação

em neurônios, células da glia, células de músculo liso e melanócitos. No que tange à condrogênese, Matrigel™ demonstrou ser um grande aliado, uma vez que superou a frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem obtidos sobre 3T3 e que constituía o substrato mais promissor até o ano de 2007. Os cultivos em massa (800 células por poço) da CNT sobre 3T3 apresentavam 16% dos poços com nódulos de cartilagem (CALLONI *et al.*, 2007), já os cultivos de massa com apenas 200 células de CNT sobre Matrigel™ apresentaram 80% dos poços cobertos por nódulos cartilagosos (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013).

Não restam dúvidas de que o Matrigel™ é um excelente candidato para o pódio de substratos capazes de promover a diferenciação condrocítica sem a necessidade de usar moléculas específicas que despertem o potencial mesenquimal da CNT. No entanto, (assim como 3T3, que secreta diversos fatores de crescimento), o Matrigel™ também possui adsorvido em sua matriz diversas moléculas que podem influenciar direta ou indiretamente a diferenciação celular (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). Assim, as portas continuaram abertas para a pesquisa de substratos mais conhecidos quimicamente e que ao mesmo tempo fossem capazes de possibilitar a expressão do pleno potencial da CN.

Neste cenário entra o PuraMatrix™, um hidrogel composto de 99% de água e 1% de uma sequência peptídica específica. Isto o torna um composto puro, sem a miríade de moléculas complexas que possam interferir no comportamento celular. Um outro grande benefício da utilização deste material é a possibilidade de diluí-lo, tornando-o mais denso em concentrações maiores e menos denso, portanto, mais poroso em concentrações reduzidas (ZHANG *et al.*, 2005). Utilizando PuraMatrix™ de forma pioneira no cultivo de células da CN, Taufer e colaboradores (2020) demonstraram sua eficácia na diferenciação condrocítica. As células da CNT obtidas a partir dos últimos 10 somitos de embriões de codorna no estágio de 18-24 somitos foram semeadas (400 por poço) sob diferentes concentrações de PuraMatrix™ a saber: 0,15%, 0,25% e 0,50%. Passados 7 dias, o meio de cultivo foi suplementado com fatores de diferenciação mesenquimal (FDM), tal qual utilizados por Coelho-Aguiar e colaboradores (2013), e assim, manteve-se o meio de cultivo até o dia 14 ou 21. Como resultado, temos que PuraMatrix™ é capaz de suportar a diferenciação de neurônios, células gliais, células de músculo liso, melanócitos, condrocitos, osteócitos e adipócitos. No que tange à diferenciação condrocítica, PuraMatrix™ superou Matrigel™ em termos de número e frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem, alcançando cerca de 50 nódulos por poço, com a frequência de aparecimento de 90% (TAUFER; RODRIGUES-DA-SILVA; CALLONI, 2020).

Estes trabalhos certificam que o potencial condrogênico das células da CNT é inegável, no entanto, este potencial é latente, de forma que só pode ser observado se estimulado de forma correta *in vitro*. Este estímulo é proveniente tanto de moléculas de matriz extracelular, fatores de crescimento e hormônios, como de substratos que sejam permissivos ou indutores para o pleno potencial da CNT. Dentre todos, até o momento PuraMatrix™ mostrou-se o mais promissor para a obtenção de nódulos cartilagosos a partir da CNT, pois, além de permitir um ambiente livre de moléculas que possam interferir na diferenciação, revelou maior número e frequência de aparecimento de nódulos cartilagosos (TAUFER; RODRIGUES-DA-SILVA; CALLONI, 2020).

Assim, fica claro que a potencialidade exibida *in vitro* pelas células da CNT de aves não é completamente correspondente ao destino das mesmas *in vivo*, de forma que se estimuladas corretamente, estas células podem sofrer a diferenciação em tipos celulares que vão muito além do repertório observado *in vivo* no modelo de aves (LE DOUARIN; CALLONI; DUPIN, 2008), conforme ilustrado na Figura 6.



Figura 6 - Representação do potencial vs. destino das células da Crista Neural.

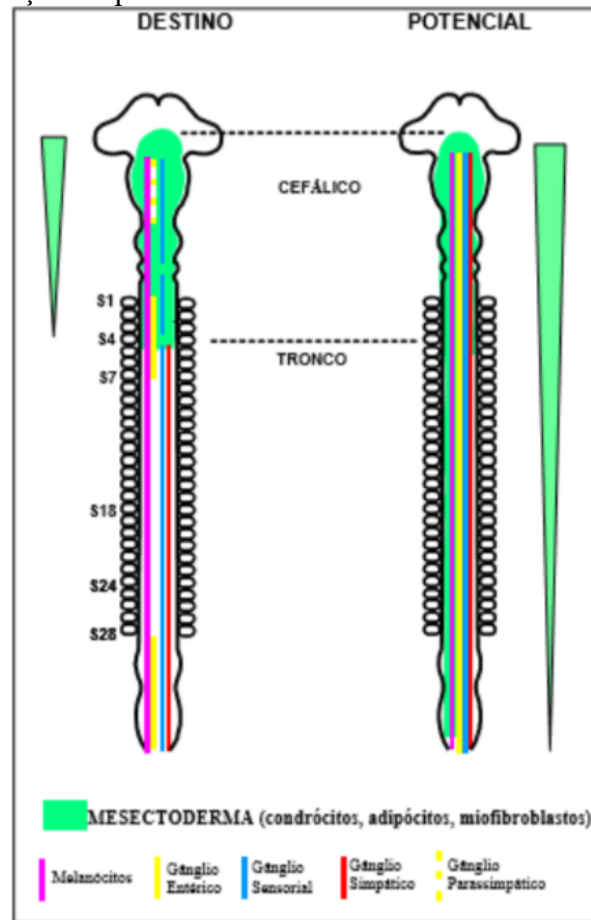


Imagem ilustrativa da diferença entre a potencialidade e o destino das células da CN. À esquerda temos o mapa de destino das células da CN, ou seja, os caminhos de diferenciação efetivamente adotados por essas células *in vivo*. Na direita está representado o potencial de diferenciação das células da CN *in vitro*; ou seja, os tipos celulares que a CN pode eventualmente originar sob determinadas circunstâncias. Células de pigmento são originadas a partir de todo o eixo embrionário e apresentam essa potencialidade *in vitro* também. Já no caso dos gânglios entéricos, sensoriais, simpáticos e parassimpáticos, apenas algumas regiões da CN são capazes de originar esses tipos celulares (como demonstrado na imagem da esquerda), no entanto, este potencial está presente em todo o eixo do embrião (ver imagem da direita). O mesmo vale para os derivados de mesectoderma, que apesar de registros *in vivo* demonstrarem que se originam exclusivamente na região cefálica em aves, exibem o potencial de diferenciação ao longo de todo o eixo embrionário (representado pelos tracejados e setas verdes nos embriões da esquerda e da direita). Fonte: Adaptado de LE DOUARIN, KELCHEIM, 1999.

#### 1.4 REDES DE REGULAÇÃO GÊNICA DA CRISTA NEURAL

Todos os processos biológicos que ocorrem nos seres vivos são dependentes da expressão de diferentes genes e suas combinações. Entender como a expressão gênica funciona é essencial para a compreensão do desenvolvimento celular e o surgimento de doenças. O processo de expressão gênica em eucariotos envolve um grande número de proteínas que controlam e modulam a expressão gênica. Essas proteínas são denominadas fatores de transcrição e representam aproximadamente 10% de todos os genes humanos, possuindo a capacidade de se ligar a sítios específicos do DNA e modular a expressão de genes próximos (SMITH; MATTHEWS, 2016). Além disso, também existem muitos genes que atuam como suporte para a montagem de complexos reguladores na expressão gênica (CARROLL *et al.*, 2006). Dessa forma, muitos estudos têm-se dedicado a entender a cascata de eventos necessários para a expressão de um gene e como este interage com outros genes, formando grandes redes regulatórias e mediando as funções celulares (BABU *et al.*, 2004; KIM; REN, 2006).

As respostas moleculares e celulares obedecem a uma cascata de eventos que incluem a percepção de determinado estímulo, transmissão do sinal ao citoplasma e núcleo, expressão gênica e por fim, alterações metabólicas no interior das células que podem por exemplo, ditar trajetórias de diferenciação (DETTMER *et al.*, 2007; LEWIN *et al.*, 2009), ou seja, as células possuem diferentes receptores para diferentes ligantes, a junção entre um ligante e seu respectivo receptor, é o gatilho para que o sinal seja transmitido para o citoplasma da célula e a partir disto, é disparada uma cascata de sinalização que pode resultar em alterações a nível transcricional na célula (Figura 7).

Figura 7 – Da sinalização à transcrição gênica.

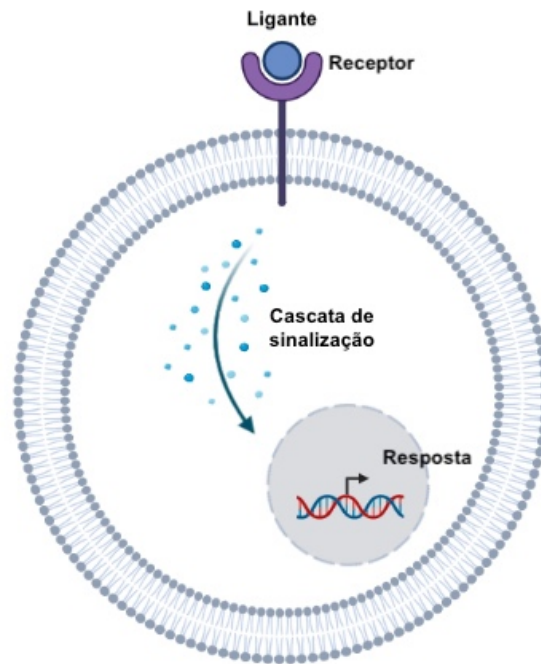


Ilustração representando de forma básica as diferentes etapas celulares desde à recepção de um sinal até a resposta para o mesmo, com a transcrição gênica. Primeiramente, faz-se necessário que um ligante (molécula extracelular) se acople ao seu respectivo receptor, com isso, é desencadeada a transmissão do sinal para o citoplasma da célula e posteriormente para o núcleo, que pode responder ao sinal com a transcrição de determinados genes. Fonte: Própria autora.

No último século, muito foi descoberto e documentado a respeito da plasticidade das células da CN e sua contribuição para vários tecidos (LE DOUARIN; KALCHEIM; 1999). Em contrapartida, avanços na biologia molecular permitiram que o nosso conhecimento sobre o controle genético dos processos intracelulares fosse aos poucos, melhor elaborado e compreendido. Neste cenário, a biologia molecular e do desenvolvimento se integraram, e os eventos no desenvolvimento da CN começaram a ser apreciados através de um viés molecular (SIMÕES-COSTA et al., 2014).

A identificação de diversos fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento da CN criou a demanda de resposta para a seguinte pergunta: como esses genes regulam uns aos outros? Através de trabalhos principalmente focados em ganho e perda de função, começaram a surgir pequenos circuitos regulatórios que buscavam explicar a dinâmica de ativação e inibição dos genes durante as diversas etapas de desenvolvimento da CN, começando por sua especificação e resultando na diferenciação em determinados tipos celulares (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004). O conhecimento que foi sendo obtido a partir

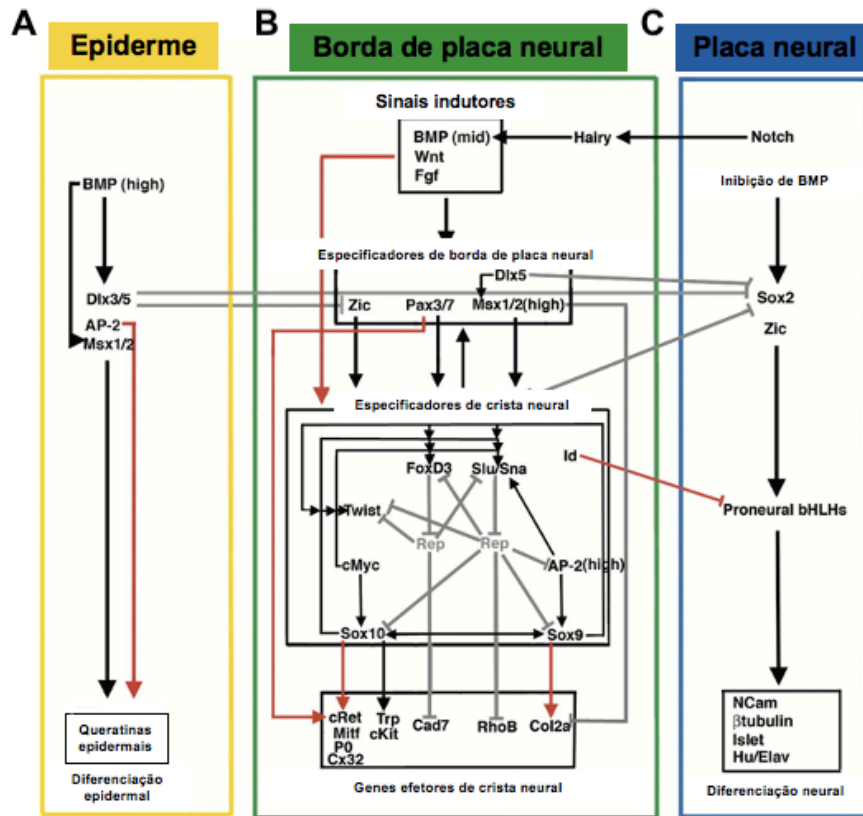
das informações regulatórias em vários modelos animais, levou à criação do conceito de rede gênica regulatória da CN, que nada mais é do que um olhar molecular para o processo de formação e desenvolvimento destas células (BETANCUR; BRONNER-FRASER; SAUKA-SPENGLER, 2010).

No ano de 2004 foi lançada por Meulemans e Bronner-Fraser a primeira rede gênica regulatória da CN nos animais vertebrados, que reuniu informações de mais de 100 publicações para descrever as sinalizações necessárias e os genes envolvidos no processo de desenvolvimento da CN (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004). Desde então, outros trabalhos foram publicados pelo grupo de Marianne Bronner e Marcos Simoes-Costa, aprimorando a rede gênica da CN com a inserção de novos genes e consequentemente, novos circuitos regulatórios de expressão (AZAMBUJA; SIMOES-COSTA, 2021; SIMÕES-COSTA et al., 2014; SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015). Apesar das incontestáveis contribuições que os trabalhos sucessores trouxeram à rede gênica pioneira da CN proposta por Meulemans e Bronner-Fraser em 2004, esta permanece sendo uma excelente demonstração de como uma rede se organiza e expõe os elementos necessários para a formação e desenvolvimento da CN, descritos a seguir.

Nos vertebrados, a ectoderme dorsal é inicialmente segregada em domínios putativos que correspondem à epiderme, borda de placa neural e placa neural por cascatas de sinalização distintas, mas em interação. O destino de epiderme é disparado por altos níveis de sinalização de BMP, que atua ativando a expressão de uma bateria de fatores de transcrição que por sua vez, irão desencadear a ativação de genes efetores específicos de epiderme e envolvidos com a produção de queratina, como *Dlx3/5*, *Msx1/2* e *Ap2* (Figura 8<sup>a</sup>). Já no domínio de placa neural, a sinalização de BMP tende a ser inibida, possibilitando a expressão de genes efetores neurais, como o grupo de genes Sox B (*Sox1*, *Sox2* e *Sox3*) e *Zic*, que fomentam a expressão de genes pró-neurais e finalmente, genes de diferenciação neuronal, como *Islet* e  $\beta$ -*Tubulina* (Figura 8C). Entre o domínio de epiderme e placa neural, encontra-se a borda de placa neural (BPN), é a partir dessa região que as células da CN irão se formar. Nesse domínio são disparados sinais de WNT e FGFs – além de níveis intermediários de BMP – que induzem a expressão de genes especificadores de BPN, como *Zic*, *Msx1/2*, *Pax3/7* e *Dlx5*, que irão contribuir para a ativação de genes que especificam as células da CN, como *FoxD3*, *Ap2*, *Sox10* e *Sox9*. A expressão desses genes especificadores é mantida durante a migração da CN e se estende até sua diferenciação, momento em que será conferida à CN uma identidade celular com a expressão

de genes restritos a determinados tipos celulares, como *Col2a1*, para o destino condrocítico (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004) (Figura 8B).

Figura 8 – Primeira rede gênica regulatória da CN publicada na literatura.

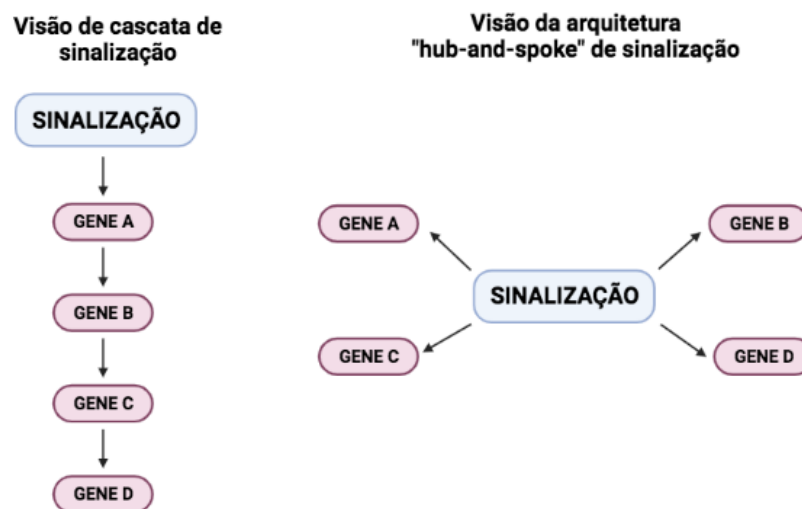


Primeira rede gênica regulatória da CN publicada na literatura. Nos vertebrados, a ectoderme dorsal é segregada em três domínios que correspondem à epiderme (amarelo), borda de placa neural (verde) e placa neural (azul). O destino de epiderme é especificado por altos níveis de BMP, que em última instância, resulta na produção de queratinas epidermais. O destino de BPN se dá pela sinalização conjunta de WNT, FGFs e níveis medianos de BMP, que irão resultar nos especificadores de BPN e posteriormente, especificadores da CN. Para a diferenciação neuronal, é necessária a inibição de BMP, para que genes efetores neurais possam ser expressos. Na figura, as flechas vermelhas indicam sinalizações diretas, flechas pretas indicam sinalizações obtidas a partir de estudos de perda e ganho de função e flechas cinzas indicam relações inibitórias. Fonte: Adaptado de (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004).

As redes regulatórias compõem uma ferramenta de visualização da paisagem molecular da célula e possuem uma lógica própria de organização e funcionamento, de forma que um mesmo gene pode atuar de diferentes maneiras, em passos distintos nas etapas sequenciais de desenvolvimento da CN (HOVLAND; ROTHSTEIN; SIMOES-COSTA, 2020).

O avanço da tecnologia e da própria Ciência impulsionaram o surgimento de novas abordagens para o estudo da paisagem genética e epigenética das células. Assim, os processos moleculares tendem a ser vistos de uma maneira muito mais integrada e dinâmica dentro das células e a visão clássica da regulação “a montante” e “a jusante” tem dado espaço e lugar para outros pontos de vista, como a arquitetura “hub-and-spoke”. Esta última visão da paisagem regulatória foi proposta recentemente por Azambuja e Simoes-Costa (2021) que interpretam e organizam as informações das redes regulatórias de uma maneira muito mais dinâmica, onde uma sinalização – no trabalho, foi estudada a sinalização de WNT – representa um centro e regula vários pontos adjacentes ao mesmo tempo, que representam outros genes e circuitos regulatórios (AZAMBUJA; SIMOES-COSTA, 2021) (Figura 9).

Figura 9 – Visão de cascata de sinalização vs. Arquitetura “hub-and-spoke” de sinalização.



Esquema de representação básico e comparativo entre a visão clássica de cascata de sinalização “a montante” e “a jusante” com a visão “hub-and-spoke” de sinalização. Na forma de cascata, as interações entre os genes são vistas de uma forma mais reducionista, ao contrário do que é observado quando se representa uma sinalização como um centro regulador de diversos genes, o que é observado na arquitetura “hub-and-spoke”. Fonte: Própria autora.

### 1.5 A RELAÇÃO ENTRE FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS TIPO 8 (FGF8) E A CONDRÓGENESE NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

A família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) nos animais vertebrados é composta por 18 membros (FGF1-10 e FGF16-23) e dividida em seis subfamílias, das quais, cinco estão relacionadas com sinalização parácrina e, uma, com sinalização endócrina (BEENKEN; MOHAMMADI, 2009). Para exercerem sua sinalização, os polipeptídeos de FGF se ligam a receptores transmembranares tirosina cinase, denominados receptores de FGF (FGFR) que após a ligação receptor-ligante sofrem uma dimerização e disparam no interior da célula diferentes cascatas de sinalização (THISSE; THISSE, 2005), para uma representação, vide Figura 7. Assim, os FGFs representam uma grande família de moléculas que são secretadas e ao ligarem-se aos seus receptores cognatos, ativam vias de transdução de sinais que são importantes para diversos passos no desenvolvimento embrionário (RAY et al., 2020). Devido à ampla gama de vias de sinalização ativadas a partir dos FGFs, estes devem ser regulados no contexto espaço-temporal do embrião em desenvolvimento e sua duração e intensidade sofrem um controle igualmente rígido (THISSE; THISSE, 2005).

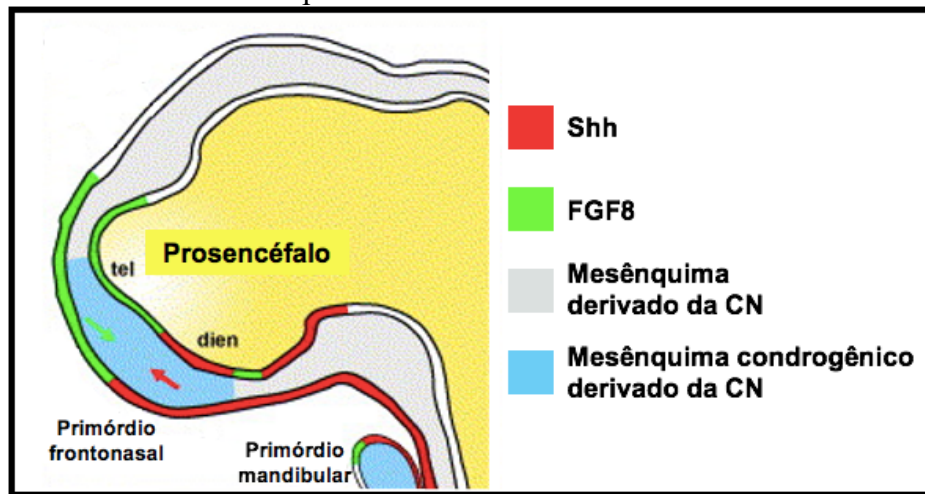
Os diferentes FGFs atuam através da repressão e ativação de determinados genes. As células da CN são responsivas à diversos FGFs capazes de instruí-las e/ou direcioná-las para um destino celular específico. Diferentes grupos de pesquisa já demonstraram que o tratamento com FGFs é hábil em promover a diferenciação condrogênica destas células (DA COSTA; TRENTIN; CALLONI, 2018; IDO; ITO, 2006; MCGONNELL; GRAHAM, 2002; SARKAR et al., 2001; SHAO *et al.*, 2015; TRAINOR; ARIZA-MCNAUGHTON; KRUMLAUF, 2002).

Entre os membros da família dos FGFs descritos, FGF8 parece ser, até o momento, o mais complexo estruturalmente. Em um primeiro estudo, a análise molecular de *Fgf8* demonstrou que este gene codifica duas isoformas de proteínas, que diferem uma da outra apenas na região N-terminal da cadeia polipeptídica (SATO et al., 1993). Posteriormente, utilizando técnicas mais modernas de mapeamento genético, Crossley e colaboradores vieram a demonstrar que o gene de *Fgf8* é capaz de codificar sete isoformas diferentes de proteínas (CROSSLEY; MARTIN, 1995). Em 1994, Heikinheimo e colaboradores descreveram alguns aspectos do padrão de expressão de *Fgf8* em embriões de camundongo. Análises de hibridização *in situ* demonstraram que o RNA de *Fgf8* estava localizado em centros de sinalização conhecidos que são capazes de direcionar o crescimento e a padronização de diferentes regiões do corpo do embrião, incluindo os membros, o eixo alongado do corpo, a região facial e a fronteira entre o mesencéfalo e o rombencéfalo. Esses dados mostram que a

via de sinalização de FGF8 pode desempenhar um papel chave no desenvolvimento das regiões supracitadas (HEIKINHEIMO A'B et al., 1994).

No que tange à condrogênese a partir das células da CN, FGF8 possui um papel muito central, uma vez que no embrião em desenvolvimento, conforme apontou Heikinheimo (1994), este morfógeno é secretado a partir do neuroepitélio na região fronteira entre o mesencéfalo e o rombencéfalo, denominada ístmo. No momento inicial da emigração, as células da CNC entram em contato com o FGF8 que está sendo secretado de forma intermitente pelo ístmo. Posteriormente, ao chegarem no primeiro arco faríngeo essas células entrarão novamente em contato com o FGF8 produzido localmente. Esse FGF8 atuando sinergicamente com o morfógeno Shh serão essenciais para promover a diferenciação de células mesenquimais e originar a estrutura craniofacial do embrião em desenvolvimento (ABU-ISSA et al., 2002; ABZHANOV; TABIN, 2004; TUCKER et al., 1999) (Figura 10).

Figura 10 – FGF8 e Shh agem sinergicamente para promover a diferenciação mesenquimal a partir das células da CNC.



Representação da sinalização de FGF8 e Shh. Ao emigrarem a partir do primeiro rombômero e povoar o primórdio frontonasal e mandibular, as células da CNC entram em contato com a sinalização de Shh e FGF8. A ação dessas duas moléculas em conjunto é essencial para que as células possam adotar um caminho de diferenciação condrogênica e posteriormente contribuir para a formação das estruturas esqueléticas da face. tel: telencéfalo; dien: diencéfalo. Fonte: Adaptado de (ABZHANOV; TABIN, 2004).

O FGF8 foi uma molécula chave para desvendar uma grande questão a respeito da natureza das células da CNC e a padronização necessária para construção das estruturas da face:



as células já estariam pré-programadas a originar as estruturas da face antes da sua emigração a partir do TN ou haveria certa plasticidade e elas não estariam pré-programadas, mas iriam adquirindo progressivamente do ambiente as informações necessárias à construção facial?

A hipótese da pré-programação era sustentada por trabalhos de transposição de tecidos, sendo inaugurada com o trabalho referência de Drew Noden, publicado em 1983. Este pesquisador enxertou precursores da CNC do primeiro arco branquial (AB1) e da região frontonasal para regiões mais posteriores do eixo embrionário de galinha e observou que onde quer que eram transplantadas, essas células originavam cópias dos derivados do AB1, como os ossos quadrado e a cartilagem de Meckel (NODEN, 1983). A partir destes experimentos, Noden interpretou que as células da CN são pré-programadas antes mesmo de sua saída do TN, de forma que independentemente do local para onde são transplantadas, carregam informações posicionais e a estas, permanecem fiéis. O modelo de pensamento de pré-padroneamento foi utilizado para explicar outros experimentos, como os trabalhos que observavam duplicações dos derivados do AB1 quando a expressão de *HoxA2* ou *HoxA3* eram inibidas dos arcos posteriores de embriões de camundongos. Os pesquisadores acreditavam que com a inibição dos genes *Hox*, a identidade posicional das células era alterada e com isso, elas passavam a adotar um comportamento de células que colonizam o AB1 (GENDRON-MAGUIRE et al., 1993; RIJLI et al., 1993).

Devotando sua atenção à sinalização de FGF8 nas células da CNC, Trainor e colaboradores (2002) descobriram uma nova forma de interpretar os resultados de seus antecessores. Observando com acurácia que os transplantes da CNC da região frontonasal ou do primeiro arco branquial realizados por Noden (1983) carregavam um aspecto em comum: a provável inclusão do istmo no tecido transplantado e, portanto, uma provável explicação para seus resultados poderia ser a inclusão de um centro sinalizador junto com os progenitores da CNC. Para testar esta hipótese, o istmo junto com algumas células próximas dos lados esquerdo e direito desta região, foi transplantado *in ovo* no lugar do rombômero 4 (r4) em embriões de galinha no estágio de 8 a 9 somitos. Importante: as células da CN localizadas nessa altura do eixo embrionário migram para o segundo arco branquial (AB2) e expressam *HoxA2*. Passadas 24 ou 48h, os pesquisadores perceberam que apesar da migração das células ter se mantido intacta, a expressão de *HoxA2* fora inibida pela presença do istmo. Lembremos que o istmo é um grande produtor de FGF8, dessa forma, os autores propuseram que a sinalização de FGF8 seria a responsável por inibir a expressão de *HoxA2*.

Para certificar-se de sua hipótese de que FGF8 seria especificamente a molécula efetora, o grupo testou o efeito a longo prazo de FGF8 sozinho na expressão de *HoxA2* nas células da CNC, com adição de *beads* – esferas embebidas com FGF8 – na região do r4 em embriões de galinha no estágio de 8 a 9 somitos. Após 24h de cultivo *in ovo*, a expressão de *HoxA2* se mostrou reprimida em todo AB2, sugerindo que com a sinalização do ístmo inibindo *HoxA2*, as células da CN do AB2 passam a adotar um comportamento de AB1. Com o intuito de atacar o problema por um outro ponto de vista, foi realizado o enxerto da CN mesencefálica (com e sem a região do ístmo incluída) na região do r4 de embriões de mesmo estágio dos utilizados nos experimentos anteriores. Após a cultura *in ovo* por 8 dias, constatou-se que nos transplantes incluindo o ístmo, houve perda das estruturas do AB2 derivadas das células que migram da região do r4, enquanto que nos transplantes que não incluíam o ístmo, a morfologia esquelética apresentava-se normal (TRAINOR; ARIZA-MCNAUGHTON; KRUMLAUF, 2002). Este estudo estabeleceu que as células da CNC não são pré-determinadas antes de sua saída do TN e, portanto, sua padronização é baseada na plasticidade e na capacidade destas células em equilibrar e responder a sinais instrutivos do microambiente.

A presença de FGF8 no embrião em desenvolvimento garantindo o correto desenvolvimento do AB1 também foi demonstrada com o uso da ferramenta de edição gênica *Cre-LoxP* (TRUMPP et al., 1999). Com esta técnica, a inativação de um determinado gene em um tecido específico pode ser alcançada, basta que camundongos portadores do gene de interesse flanqueado por *LoxP* sejam cruzados com camundongos portando a enzima *Cre-recombinase*, assim, nas células da prole de seus descendentes, o gene de interesse permanecerá inativo. Um estudo demonstra que os embriões de camundongos que possuem a inativação de *Fgf8* sobrevivem ao nascimento, no entanto, perdem a maioria das estruturas derivadas do AB1 (TRUMPP et al., 1999). Com este resultado em mãos, o grupo hipotetizou que a falha no surgimento das estruturas derivadas do AB1 poderia estar relacionada com algum tipo de falha na migração da CN e, assim, prosseguiram com a análise de migração e proliferação nestas células. Entretanto, ambas se mostraram inalteradas. No entanto, foi observado que nos embriões onde a expressão de *Fgf8* foi inativada existia uma grande quantidade de células mortas ou em apoptose (TRUMPP et al., 1999). Portanto, estes resultados sugerem que o FGF8 secretado pelo ístmo é essencial para a sobrevivência das células mesenquimais que povoam o AB1 e posteriormente, diferenciam-se em elementos craniofaciais.

No que tange à região do tronco dos embriões, o papel da sinalização de FGF8 foi demonstrado na migração das células da CNT pela rota ventral (DUNKEL et al., 2020). De acordo com Dunkel e colaboradores (2020), FGF8 exerce um efeito quimiocinético sobre a CNT de forma a promover e sustentar a migração destas células para a formação do sistema nervoso periférico em embriões de ave no estágio de 16 somitos (DUNKEL et al., 2020).

Tendo em vista o papel já bem documentado de FGF8 na formação dos componentes do esqueleto craniofacial, permanecem em aberto as investigações acerca do seu efeito sobre a condrogênese a partir das células da CNT, uma vez que como mencionado no tópico anterior, condições de cultivo *in vitro* são eficazes em despertar o potencial cartilaginoso destas células. As células da CNC e CNT compartilham uma série de derivativos – células de pigmento, neuronais, gliais, etc. – o que resulta de circuitos gênicos igualmente compartilhados (ABZHANOV et al., 2003; SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015). Por conta dos relatos na literatura demonstrando FGF8 como um grande promotor do destino ectomesenquimal, além da sua ampla contribuição na embriogênese, este fator de crescimento parece um excelente candidato para a obtenção de nódulos cartilagosos a partir das células da CNT. Além disso, seria interessante investigar se a rede gênica regulatória para diferenciação condrocítica nas células da CNC é a mesma utilizada pelas células da CNT para originar o tipo celular em questão.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os mecanismos de surgimento, migração e diferenciação das células da CN tem fascinado cientistas ao redor do mundo por mais de 150 anos. Mesmo sendo um modelo experimental amplamente empregado em estudos de Biologia do Desenvolvimento, ainda existem muitas questões a serem clarificadas acerca do seu potencial de desenvolvimento, uma destas questões é a capacidade de diferenciação condrocítica das células da CNT. Embora documentada por diversos grupos de pesquisa em ensaios *in vitro* sob condições de cultivo específicas, o mecanismo molecular que faz a ponte entre o que é observado nas culturas com nódulos de cartilagem obtidos a partir da CNT e o que acontece de fato no interior da célula em termos de transcrição gênica, permanece elusivo. Compreender quais as mudanças na expressão dos genes acontecem nas células quando submetidas a condições de cultivo favoráveis para a formação de nódulos cartilagosos, é a chave para desvendar como essa diferenciação ocorre nas células da CNT e o porquê de não ser observada *in vivo* na maioria dos animais modernos, onde a CNC é protagonista na formação da cartilagem da face.

Este trabalho demonstra que o tratamento com FGF8 é suficiente em promover a diferenciação condrocítica a partir das células da CNT. Além disso, acessa o comportamento molecular das células através da análise de seus transcritos e como estes respondem ao tratamento com FGF8. A evolução – tanto das espécies, quanto do conhecimento produzido ao longo de décadas – deixa as suas marcas. O presente trabalho sugere que o potencial condrogênico das células da CNT faz parte de uma herança evolutiva destas células, ao mesmo tempo em que deixa a sua própria marca: a primeira rede regulatória das células da CNT que demonstra a via de sinalização necessária para a diferenciação em células de cartilagem.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito do tratamento com o fator de crescimento FGF8 em culturas primárias de células da CNT, em conjunto com uma análise transcriptômica de células tratadas ou não tratadas com o morfógeno.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de diferenciação condrogênica das células da CNT tratadas ou não tratadas com FGF8 durante o período de migração;
- Analisar as diferenças em termos de expressão gênica entre as células da CNT tratadas ou não tratadas com FGF8 durante o período de migração;
- Interpretar dados e resultados da literatura pré-existente acerca do potencial condrogênico das células da CNT à luz dos dados obtidos a partir da análise transcriptômica;
- Propor uma rede de regulação transcricional necessária para a diferenciação cartilaginosa a partir das células da CNT.

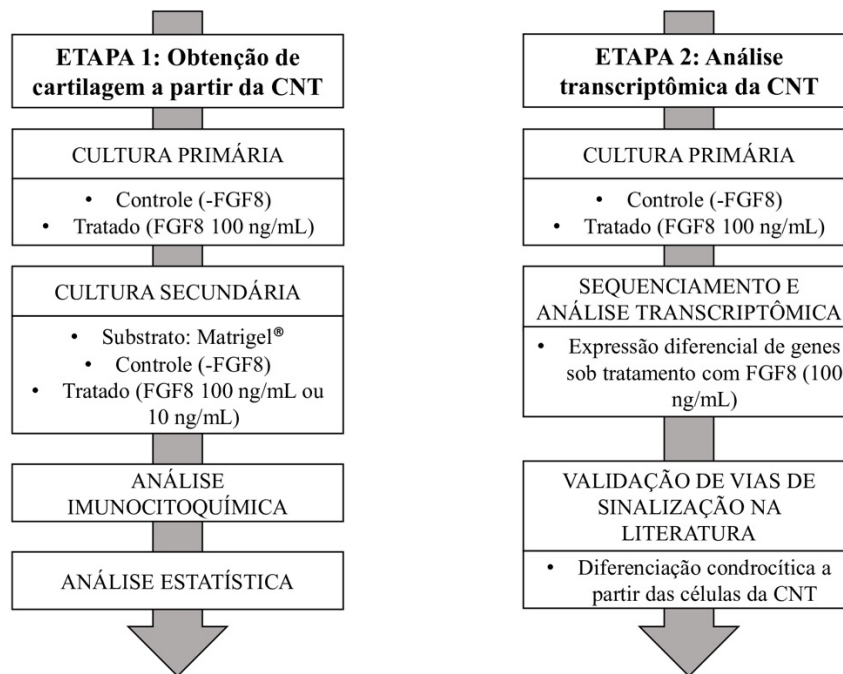
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, cumpre enfatizar que os experimentos iniciais de cultivo celular que compõem a primeira etapa deste Trabalho de Conclusão de Curso foram desenvolvidos no ano de 2014, por uma então aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento da UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni. Estes dados nunca foram apresentados ou publicados na íntegra anteriormente, pois a referida aluna mudou de orientador. Dessa forma esses resultados ficaram por muito tempo guardados e sequer haviam sido analisados estatisticamente. Meu trabalho nesse ponto foi recuperar esses dados e trabalhar a parte estatística dos mesmos. Importante salientar que descrevo toda a metodologia empregada para a obtenção desses dados, uma vez que grande parte de minha Iniciação Científica foi devotada a aprender e realizar culturas da CNT. Infelizmente a pandemia de Covid19, interrompeu a parte prática que eu estava executando no laboratório do prof. Giordano.

Na primeira etapa, foram realizadas culturas primárias e secundárias da CNT sob diferentes concentrações de tratamento com FGF8, a fim de verificar o efeito deste morfógeno na diferenciação condrocítica nessas células e contabilizar o número e a frequência de nódulos de cartilagem existentes no final dos 10 dias de cultura secundária.

Na segunda etapa, foram realizadas culturas primárias da CNT tratadas ou não com FGF8. As amostras foram encaminhadas para o Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ/Paraná), onde foram submetidas ao sequenciamento de RNA e posterior análise transcriptômica. A partir da análise e estudo da tabela, foram feitas inferências sobre as redes regulatórias que controlam o processo de escolha de destino condrocítico pelas células da CNT. As duas etapas do trabalho estão explicitadas e resumidas de forma didática na Figura 11.

Figura 11 – Fluxograma resumindo as atividades desenvolvidas neste trabalho.



Fonte: Própria autora.

#### 4.1 ETAPA 1 – OBTENÇÃO DE CARTILAGEM A PARTIR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL

##### 4.1.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL

Para obter as células da CNT, foram utilizados embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) vindos de uma granja localizada em Rio do Sul – SC. Inicialmente, os ovos foram acondicionados em uma incubadora à 37°C e com umidade relativa de 65% durante 46 horas. Após as 46 horas, os ovos foram abertos de modo a utilizar os embriões que estavam no estágio 12 HH (HAMBURGUER; HAMILTON, 1951) de desenvolvimento, neste estágio, os embriões apresentam por volta de 18 a 22 somitos. Manualmente, com o uso de instrumentos cirúrgicos e controle microscópico, os tubos neurais dos embriões foram excisados no nível dos últimos 10 somitos e posteriormente tratados com pancreatina, de forma a descolar os tecidos adjacentes ao tubo neural. Uma vez isolados, os tubos neurais foram transportados para uma placa de Petri

de 35mm, onde permaneceram durante 15 horas em uma estufa à 37°C em atmosfera com 65% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Por 15 horas, as células da CN migraram a partir do tubo neural para a placa, de onde foram retiradas posteriormente. Durante este período, as células da condição controle, estavam embebidas em meio básico de cultivo ( $\alpha$ -MEM, SBF 10%, EE 2% e Glutamina 1%), enquanto no tratamento, o meio foi suplementado 100 ng/mL de FGF8 junto ao meio básico de cultivo. Os procedimentos deste trabalho estão devidamente registrados no Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC sob o seguinte protocolo: CEUA n° 2454250219 (ID 001164).

#### **4.1.2 CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL**

Após as 15h de cultivo, os tubos neurais foram removidos da placa e descartados, enquanto as células da CNT que emigraram a partir dos tubos neurais continuaram aderidas à placa de cultivo. Através de uma solução de Tripsina com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em uma concentração de 0,05% (Gibco), as células da CNT foram descoladas da placa de cultivo. Em seguida, as células foram acondicionadas em um tubo contendo meio básico de cultivo e centrifugadas a 486 G durante 7 minutos, de forma a ocorrer a precipitação dessas células. O sobrenadante foi descartado e em gotas de 12  $\mu$ L na câmara de contagem Malassez, as células foram quantificadas e posteriormente diluídas. Após a quantificação e diluição, as células foram plaqueadas em gotas de 100  $\mu$ L, acondicionando uma quantidade de 400 células por poço em placas de cultivo de 96 poços (Corning, NY, USA), diluídas em meio básico (grupo - FGF8) e meio básico com adição de FGF8 nas concentrações de 10 e 100 ng/mL (grupo + FGF8).

As células foram mantidas na estufa de cultivo a 37 °C em atmosfera com 65% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>, durante os 10 dias de cultura secundária, com a manutenção do meio de cultivo sendo feita a cada 2 dias.

#### **4.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS NÓDULOS DE CARTILAGEM**

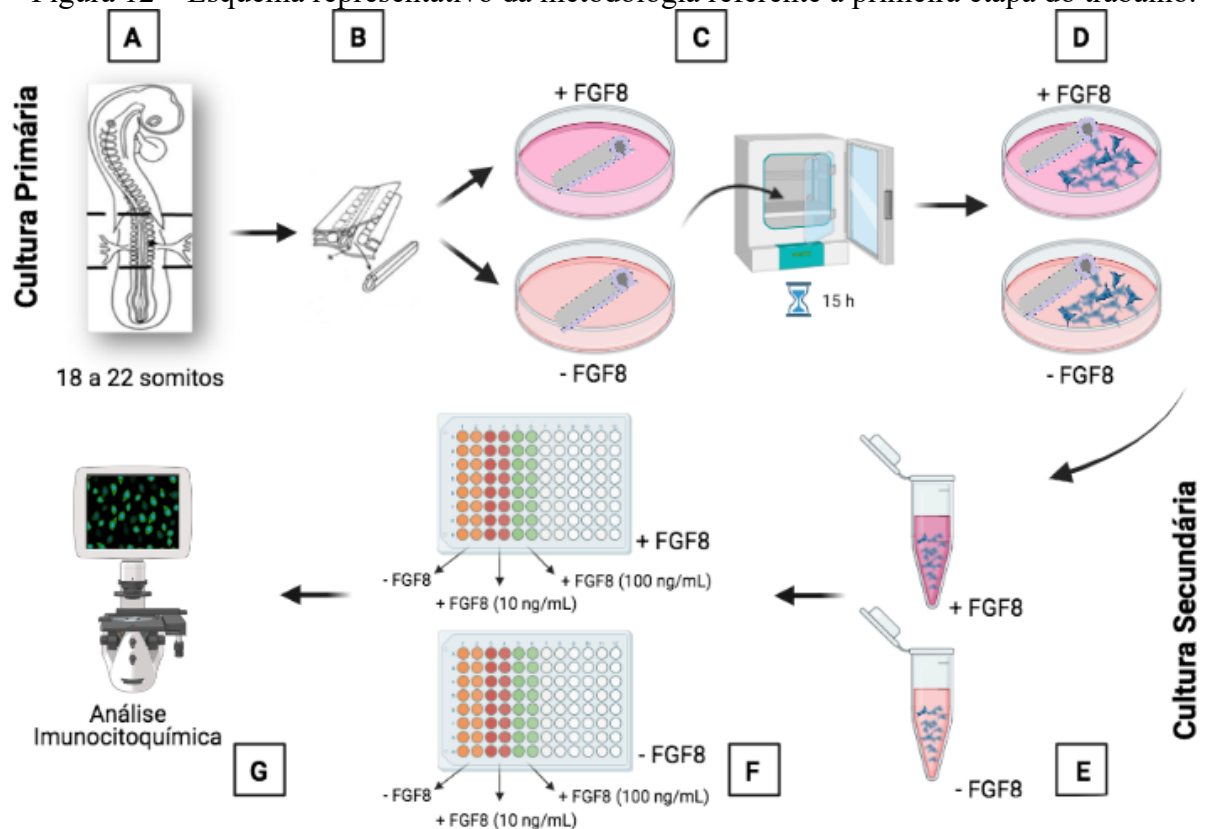
Passados os 10 dias de cultura secundária, as células da CNT foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%. Após fixadas, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 na concentração de 0,25% durante 40 minutos, em seguida, foi utilizada a solução bloqueadora de SBF 10% diluído em PBS durante 30 minutos. Após esse processo de preparação, as culturas foram incubadas com o anticorpo primário Condroitin Sulfato (CS) na concentração de 1:400



e mantidas durante 15h (geralmente overnight). Para a visualização em microscópio de fluorescência as células foram tratadas com anticorpo secundário Alexa 488, que emite fluorescência verde. Para identificação dos núcleos das células, foi utilizado o corante DAPI na concentração de 1:800.

Uma outra alternativa para a identificação de nódulos de cartilagem nas culturas foi a utilização da coloração Azul de Alcian. Para tanto, foi dissolvido 0,5g de Azul de Alcian em 50mL de água destilada e 0,5mL de ácido acético em 50mL de água destilada. Essas duas soluções foram misturadas e filtradas em papel filtro (Gibco). Então, as culturas receberam 100 µL por poço desta solução e foram deixadas em repouso durante 20 min. Após o repouso, foram realizadas lavagens e posterior observação dos nódulos de cartilagem no microscópio óptico (Figura 12).

Figura 12 – Esquema representativo da metodologia referente à primeira etapa do trabalho.



- (A) Embrião de codorna no estágio de 18 a 22 somitos. As linhas tracejadas representam a região do embrião que foi excisada. (B) Na presença de pancreatina, o TN é isolado dos tecidos adjacentes. (C) Os TNs isolados são semeados em uma placa com meio de cultivo básico ou suplementado com FGF8 e acondicionados durante 15h em uma

estufa. (D) Durante o período de incubação de 15h, as células da CN emigram a partir do TN. (E) Células da CNT são isoladas. (F) As células isoladas de culturas primárias tratadas ou não com FGF8 são semeadas em placas de cultura celular com diferentes condições de cultivo: sem a presença de FGF8, 10 ng/mL de FGF8 e 100 ng/mL de FGF8. (G) Análise imonocitoquímica para acessar os tipos celulares. Fonte: Própria autora.

#### **4.1.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi realizado o teste ANOVA two-way. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad ® Prisma. Diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,01$ .

### **4.2 ETAPA 2 – SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL**

#### **4.2.1 PREPARO PARA ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA**

A cultura primária foi realizada igualmente nas duas etapas do trabalho (vide tópico 4.1.1). Após as 15h de migração, as células foram colhidas e então armazenadas em criotubos e acondicionadas nos galões criogênicos, à uma temperatura de aproximadamente  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para o envio ao ICC – FIOCRUZ/PR, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo seco, de forma a manter a temperatura baixa durante todo o percurso. Importante: nesta etapa, a cultura secundária não foi realizada.

#### **4.2.2 EXTRAÇÃO DO RNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO TRANSCRIPTOMA**

O RNA mensageiro (mRNA) foi extraído e isolado a partir das amostras de células da CNT, sendo três amostras de células tratadas com FGF8 e três amostras de células não tratadas com FGF8. Após a extração, o mRNA foi convertido para DNA complementar (cDNA) e assim, a biblioteca de cDNA foi preparada para a amplificação e sequenciamento em uma plataforma NGS. A principal característica do NGS é a possibilidade de realizar o sequenciamento de DNA

em plataformas capazes de gerar milhares de informações sobre milhões de pares de bases, tudo isso em uma única etapa.

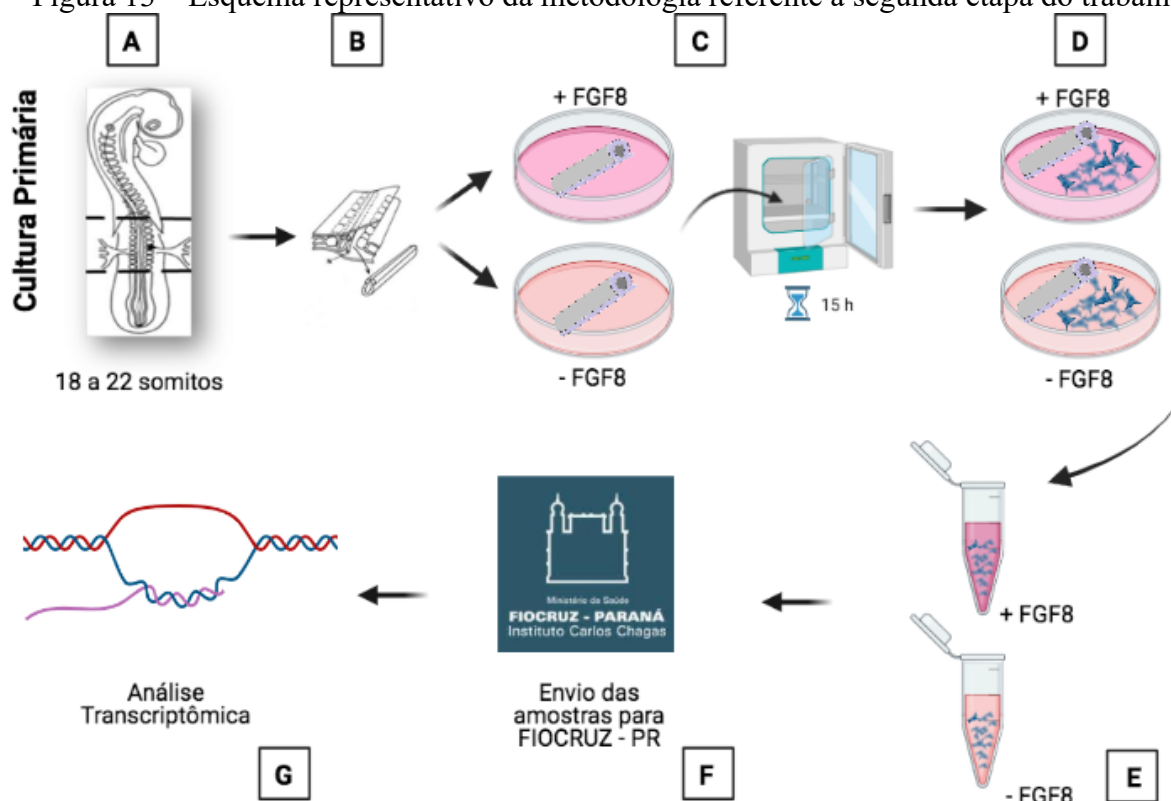
Para realizar um ensaio de Rna-Seq, é necessário que algumas etapas sequenciais sejam seguidas, sendo elas: 1) extração e isolamento do RNA do organismo de interesse; 2) Conversão do RNA para DNA complementar (cDNA); 3) preparo da biblioteca de cDNA e finalmente 4) amplificação e sequenciamento da biblioteca de cDNA em uma plataforma NGS. Findado o sequenciamento, os fragmentos obtidos – também conhecidos como *reads* – são alinhados a partir de um genoma de referência ou sem um genoma de referência, o que é conhecido como alinhamento *de novo*, quando ainda não há um genoma para ser utilizado como o referencial (KUKURBA; MONTGOMERY, 2015; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Assim, os dados de sequenciamento de RNA são utilizados e plotados em programas que analisam esses transcritos de diferentes formas. A análise bioinformática do transcriptoma permite a compreensão precisa de como a maquinaria gênica atua nos processos biológicos e permite que a expressão diferencial dos genes seja analisada. A partir da estatística de expressão diferencial, é possível hipotetizar caminhos regulatórios que a célula percorre para sofrer a diferenciação em determinado tipo celular (SONG *et al.*, 2019).

Para os propósitos deste trabalho, a saída dos dados de sequência de RNA (arquivos FASTQ) foram trimados utilizando *cutadapter* e alinhados com a última versão do genoma da espécie em questão, a saber, *Coturnix coturnix japonica*. Os arquivos SAM foram convertidos, mesclados, classificados e indexados utilizando os utilitários Samtools. As leituras alinhadas foram visualizadas por meio do software IGV (v. 2.3.82). As contagens de leituras foram acessadas utilizando Htseq (v. 0.5.4p3) aplicando os seguintes parâmetros: “-m intersection-noempty -i id\_gene -s reverse”.

A análise de expressão diferencial do gene foi realizada para comparar entre a contagem de leitura normalizada usando o pacote Bioconductor edgeR (v. 3.20.9), definindo o  $\log_2$  módulo de alteração de dobra ( $\log_2FC$ )  $\geq 1$  e a taxa de descoberta falsa (FDR) como  $\leq 0,05$  (Figura 13). Tal análise gerou como produto final uma tabela de transcritos, informando todos os genes com expressão diferencial entre as células da CNT que receberam ou não o tratamento com FGF8 no momento da cultura primária. A diferença entre o número de *reads* foi expressa através de gráficos de barras.

Figura 13 – Esquema representativo da metodologia referente à segunda etapa do trabalho.



(A) Embrião de codorna no estágio de 18 a 22 somitos. As linhas tracejadas representam a região do embrião que foi excisada. (B) Na presença de pancreatina, o TN é isolado dos tecidos adjacentes. (C) Os TNs isolados são semeados em uma placa com meio de cultivo básico ou suplementado com FGF8 e acondicionados durante 15h em uma estufa. (D) Durante o período de incubação de 15h, as células da CN emigram a partir do TN. (E) Células da CNT foram isoladas. (F) As amostras de culturas primárias foram enviadas para o Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ (G) Análise transcriptômica de células da CNT tratadas ou não com FGF8 durante a cultura primária. Fonte: Própria autora.

#### 4.2.3 IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE GENES CANDIDATOS

Os transcritos que apresentavam um valor de  $p < 0,5$  na tabela de análise transcriptômica, foram analisados no portal GeneCards® (<https://www.genecards.org/>). Este banco de dados apresenta informações 51transcriptômica, genômicas e proteômicas reunidas a partir de cerca de 150 fontes de informação diferentes. Esta primeira etapa de identificação dos genes foi uma pré-seleção, servindo para identificar genes candidatos que estariam relacionados com diferentes processos de desenvolvimento da CN, culminando na diferenciação

condrocítica. Para verificar em qual local e momento do desenvolvimento embrionário determinados mRNA são encontrados, foi utilizado o site Gheisa<sup>®</sup> (<http://geisha.arizona.edu>), que reúne imagens de hibridização *in situ* em diversos estágios do desenvolvimento de aves da espécie *Gallus gallus*.

#### 4.2.4 CONSTRUÇÃO DA BASE DE DADOS

As pesquisas bibliográficas para compor a Base de Dados deste trabalho foram realizadas na plataforma PubMed<sup>®</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), que indexa e armazena cerca de 30 milhões de artigos e ensaios de diversas revistas científicas da área de biomedicina. Majoritariamente, estes artigos podem ser acessados gratuitamente, facilitando o acesso à informação científica. Para que a investigação fosse bem sucedida, limitando e refinando os possíveis resultados, termos de busca específicos foram cruzados e os artigos foram garimpados para compor a Base de Dados (Tabela 1). Todas as informações relevantes para este trabalho foram retiradas dos artigos e armazenadas em documentos que foram consultados no decorrer do trabalho.

Tabela 1 – Termos utilizados para realizar as buscas bibliográficas.

<b>Termos de busca na plataforma PubMed<sup>®</sup></b>
Gene X* + neural crest
Gene X + trunk neural crest
Gene X + neural crest + chondrocyte
Gene X + trunk neural crest + chondrocyte
Gene X + neural crest + cartilage formation
Gene X + trunk neural crest + cartilage formation

\*O X representa os diversos genes candidatos pré-selecionados presentes na tabela de transcritos que foram submetidos à pesquisa bibliográfica.

#### 4.2.5 ANÁLISE DAS REDES REGULATÓRIAS

Para colher pistas sobre as possíveis interações nas vias de sinalização, bem como interações entre proteínas traduzidas pelos genes de interesse, foram utilizadas as plataformas PathCards<sup>®</sup> ([pathcards.genecards.org](http://pathcards.genecards.org)), String<sup>®</sup> (<https://string-db.org/>) e GeneMania<sup>®</sup>

(<https://genemania.org/>). Dentre estas, a plataforma mais utilizada para realizar o trabalho em questão foi GeneMania<sup>®</sup>, visto que a mesma mostrou-se uma ferramenta muito interessante, pela possibilidade de alocar em seu campo de busca mais de um gene, acessando assim, as interações entre genes específicos. Em todas as plataformas de busca, foram filtrados os dados do organismo *Gallus gallus*, exceto na plataforma GeneMania<sup>®</sup>, visto que a espécie *Gallus gallus* não é apresentada pelo portal, nesse caso, utilizou-se como modelo a espécie *Mus musculus*.

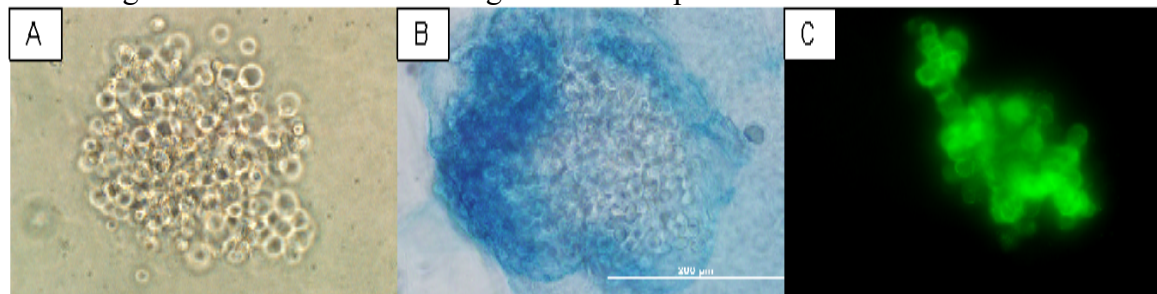
## 5 RESULTADOS

### 5.1 O TRATAMENTO COM FGF8 EM CULTURAS PRIMÁRIAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL (CNT) PROMOVE UM AUMENTO NA OBTENÇÃO DE CONDRÓCITOS EM CULTURAS SECUNDÁRIAS DA CNT.

Com o objetivo de analisar um possível papel de FGF8 em estimular a condrogênese em células da CNT, foram testadas diferentes doses e tempos de exposição a esse fator de crescimento. Em culturas primárias da CNT, correspondente às primeiras 15 horas de migração das células, FGF8 foi administrado na concentração de 100 ng/mL. Já em culturas secundárias, FGF8 foi administrado em duas diferentes concentrações (10 e 100 ng/mL) durante o período de 10 dias.

Após 10 dias de cultivo, os nódulos de cartilagem foram identificados através de microscopia de campo claro, coloração com azul de alcian e em ensaios imunocitoquímicos utilizando o anticorpo condroitin sulfato (Figura 14 A, B e C, respectivamente).

Figura 14 – Nódulos de cartilagem obtidos a partir da Crista Neural Troncal.

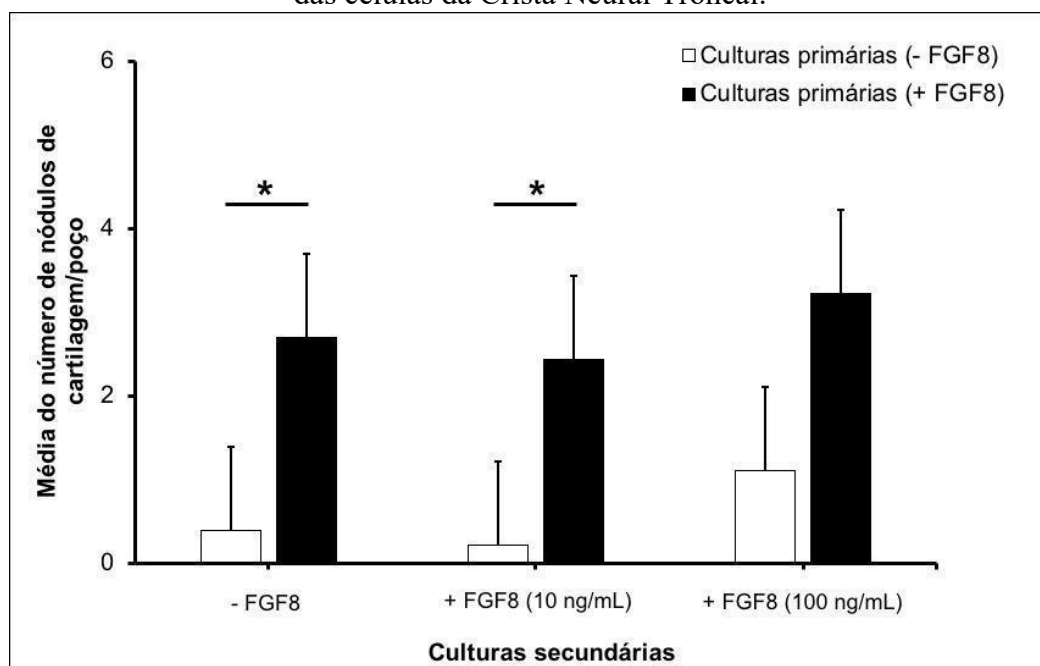


Imagens representativas de nódulos de cartilagem observados em culturas da CNT e detectados através de diferentes marcadores. (A) Nódulos de cartilagem visualizados em campo claro, (B) Nódulos de cartilagem identificados através da coloração de azul de alcian e (C) Condrócitos identificados através da técnica de imunocitoquímica utilizando o anticorpo condroitin-sulfato. Fonte: Própria autora.

Observamos que todas as culturas da CNT, tratadas ou não com FGF8, exibiram a formação de nódulos de cartilagem após 10 dias de cultivo sobre Matrigel™. Entretanto, tanto o número (Figura 15) quanto a frequência (Figura 16) de nódulos de cartilagem mostraram-se aumentados sob os diversos tratamentos com FGF8.

O gráfico da figura 15 mostra as diferenças em termos de quantidade de nódulos de cartilagem nas culturas de CNT sob tratamento ou não com FGF8 em diferentes momentos (culturas primárias e/ou secundárias) e concentrações. Todas as culturas da CNT que receberam o tratamento com FGF8 (100 ng/mL) durante as primeiras 15 horas de migração (representadas por barras de cor negra no gráfico), apresentaram um maior número de nódulos de cartilagem ao final de 10 dias de cultivo, quando comparadas às culturas que não receberam tratamento com FGF8 durante as culturas primárias (representadas pelas barras brancas). Entretanto, essa diferença foi estatisticamente significativa apenas nas culturas que não receberam FGF8 nas culturas secundárias (as duas primeiras colunas do gráfico,  $P = 0.006$ ) e nas culturas secundárias que receberam 10 ng/ml de FGF8 (terceira e quarta colunas do gráfico,  $P = 0.002$ ).

Figura 15 – Influência do tratamento de FGF8 na formação de nódulos de cartilagem a partir das células da Crista Neural Troncal.



Representação gráfica da média do número de nódulos de cartilagem identificados em culturas da CNT tratadas com FGF8 em diferentes doses e tempo de exposição. As barras representadas pela cor preta mostram o número de nódulos de cartilagem encontrados em culturas da CNT que foram tratadas com FGF8 na concentração de 100 ng/mL durante a cultura primária, enquanto as barras representadas em branco mostram o número de nódulos de cartilagem identificados em culturas da CNT que não receberam o tratamento com FGF8 durante a cultura primária. Dados obtidos de dois experimentos independentes com  $n=10$  para as duas primeiras colunas do gráfico e  $n=9$  para as demais condições. \*  $P \leq 0,01$ ; \*\*  $P \leq 0,001$  e \*\*\*  $P \leq 0,0001$ ).  
Fonte: Própria autora.



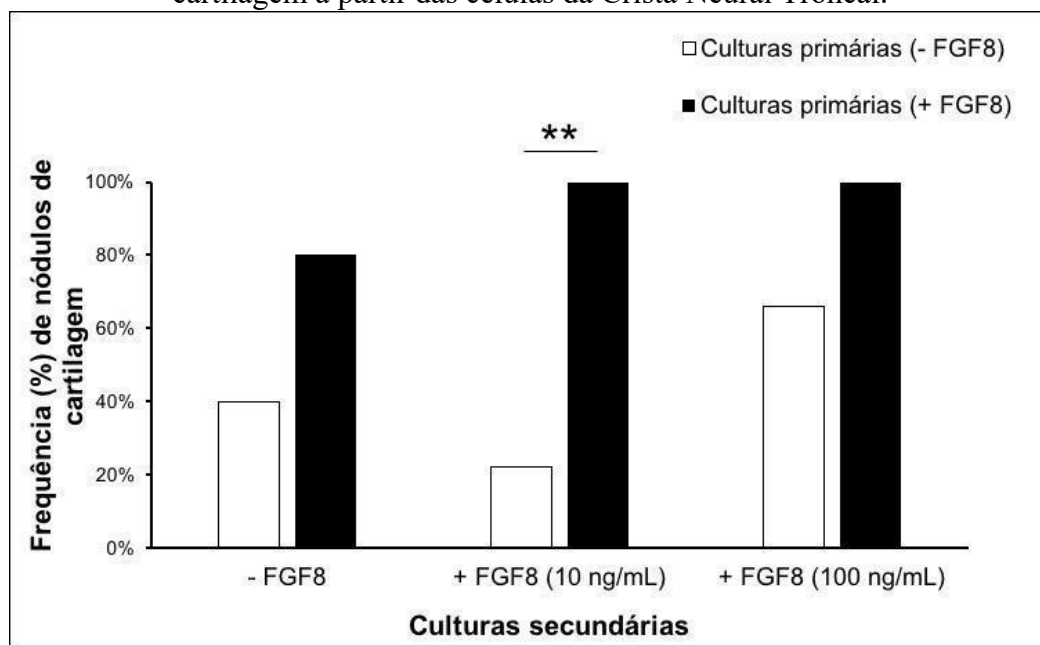
Em culturas de células que não receberam FGF8 em nenhum momento (primeira coluna do gráfico da Figura 15) foi observado em média 0,4 nódulos de cartilagem por poço, já as culturas tratadas com FGF8 apenas durante as culturas primárias (segunda coluna do gráfico da Figura 15), exibiram em média 2,7 nódulos de cartilagem por poço. Ou seja, a adição de FGF8 apenas durante as 15 horas da cultura primária promoveu um aumento de quase 7 vezes no número de nódulos de cartilagem em culturas secundárias da CNT.

Culturas da CNT que receberam tratamento com 10 ng/mL de FGF8 apenas durante as culturas secundárias exibiram em média 0,2 nódulos de cartilagem por poço (terceira coluna do gráfico 15). Por outro lado, culturas da CNT que receberam tratamento com 100 ng/mL FGF8 durante as culturas primárias e posteriormente foram tratadas com 10 ng/mL FGF8 (quarta coluna do gráfico 15), apresentaram em média 2,4 nódulos de cartilagem por poço, ou seja, um aumento de 12 vezes.

Quando cultivadas na presença de FGF8 (100 ng/mL) durante as culturas primárias e secundárias (sexta coluna do gráfico 15), as células da CNT apresentaram o maior número de nódulos de cartilagem dentre todas as condições analisadas, sendo identificados em média 3,2 nódulos de cartilagem por poço. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo ( $P=0.06$ ), isso representou um aumento de cerca de três vezes no número de nódulos de cartilagem quando comparado com as culturas tratadas com FGF8 (100 ng/mL) apenas nas culturas secundárias, onde foram encontrados 1,1 nódulos de cartilagem por poço (quinta coluna do gráfico 15).

Além de incrementar o número de nódulos de cartilagem por poço, o tratamento com FGF8 durante a fase migratória também exerceu efeito sobre a frequência de aparecimento dos nódulos de cartilagem nas culturas de células da CNT. O aparecimento de nódulos cartilagosos nas culturas secundárias que receberam o tratamento com FGF8 durante a fase migratória mostrou-se sempre superior ao observado nas culturas que não receberam FGF8 neste período, como mostrado no gráfico da Figura 16.

Figura 16 - Influência do tratamento de FGF8 na frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem a partir das células da Crista Neural Troncal.



Representação gráfica da frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem em culturas de células da CNT tratadas com FGF8 em diferentes doses e tempo de exposição. As barras representadas pela cor preta mostram a frequência de nódulos de cartilagem encontrados em culturas da CNT que foram tratadas com FGF8 na concentração de 100 ng/mL durante a cultura primária, enquanto as barras representadas em branco mostram a frequência de nódulos de cartilagem identificados em culturas da CNT que não receberam o tratamento com FGF8 durante a cultura primária. Dados obtidos de dois experimentos independentes com  $n=10$  para as duas primeiras colunas do gráfico e  $n=9$  para as demais condições. \*  $P \leq 0,01$ ; \*\*  $P \leq 0,001$  e \*\*\*  $P \leq 0,0001$ ). Fonte: Própria autora.

Em culturas completamente isentas de FGF8 (primeira coluna do gráfico 16) a frequência de aparecimento dos nódulos de cartilagem foi de 40%, enquanto que nas culturas que receberam FGF8 somente na cultura primária (segunda coluna do gráfico 16) essa porcentagem dobrou (80%).

Quando cultivadas com FGF8 durante a fase migratória e posteriormente com FGF8 a 10 ng/mL ou 100 ng/mL durante a cultura secundária (quarta e sexta colunas do gráfico 16, respectivamente) a frequência de aparecimento dos nódulos de cartilagem atingiu 100%, ou seja, em todos os poços analisados havia a presença de nódulos cartilagosos.

Nas culturas que não receberam o tratamento inicial com FGF8, sendo tratadas com FGF8 10 ng/mL durante a cultura secundária (terceira coluna do gráfico 16), foram

identificados nódulos de cartilagem em 22% dos poços, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $P = 0.001$ ). Por fim, nas culturas que receberam tratamento somente na cultura secundária com 100 ng/mL de FGF8 (quinta coluna do gráfico 16), 66% dos poços foram contemplados com a presença de nódulos de cartilagem.

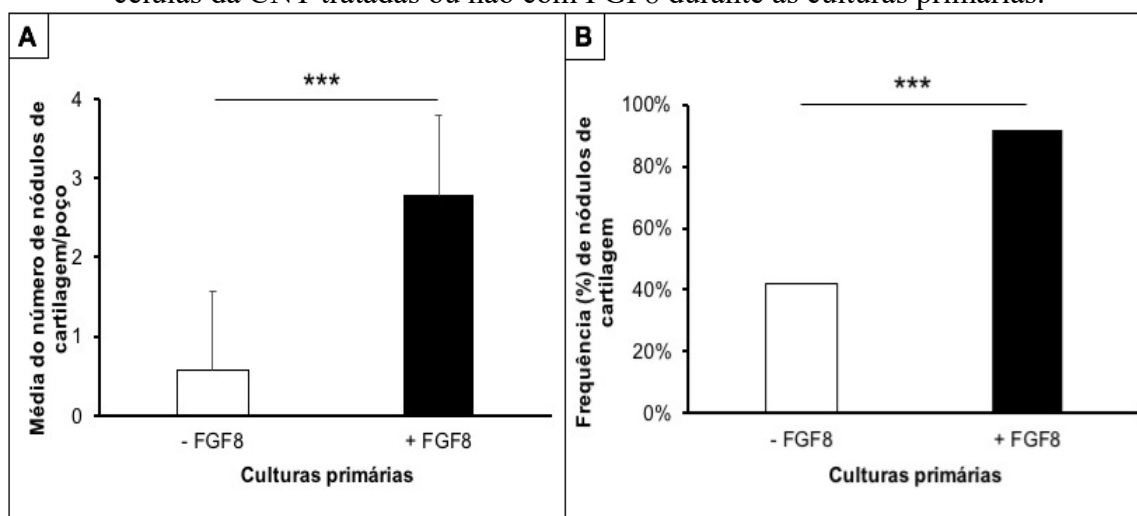
Quando os dados de todas as culturas são agrupados em função do tratamento ou não com FGF8 nas culturas primárias, portanto, não levando em consideração o tratamento adotado durante a cultura secundária, torna-se ainda mais evidente que este fator de crescimento é capaz de estimular de forma robusta o aumento no número e na frequência de nódulos de cartilagem em culturas secundárias da CNT quando administrado durante a fase migratória das culturas (Figura 17).

Todas as culturas não tratadas com FGF8 no momento da cultura primária, independentemente do tratamento empregado na cultura secundária, somaram 16 nódulos de cartilagem, totalizando uma média de 0,5 nódulos de cartilagem por poço. Enquanto isso, nas culturas tratadas com FGF8 durante a fase migratória observou-se um total de 78 nódulos de cartilagem, representado pela média de 2,7 nódulos cartilagosos por poço (Figura 17 A).

Em relação à frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem, as culturas não tratadas com FGF8 na cultura primária – novamente, independentemente do tratamento empregado na cultura secundária – apresentaram ao todo 16 nódulos de cartilagem, o que corresponde a 42% de aparecimento de nódulos cartilagosos nas culturas secundárias. Já as culturas tratadas com FGF8 durante o período de migração somaram 78 nódulos de cartilagem, representando 92% de aparecimento de nódulos cartilagosos (Figura 17 B).

Dessa forma, o tratamento com FGF8 durante as 15 horas de migração das células durante as culturas primárias mostrou ser suficiente em estimular o aumento tanto no número (Figura 17 A) quanto na frequência (Figura 17 B) de nódulos de cartilagem em culturas secundárias quando comparado com culturas da CNT que não foram tratadas com FGF8 durante a fase migratória.

Figura 17 - Número de frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem a partir de células da CNT tratadas ou não com FGF8 durante as culturas primárias.



Representação gráfica da média do número de nódulos de cartilagem (A) e da frequência de aparecimento de condrócitos (B) identificados em culturas de células da CNT que receberam ou não o tratamento com FGF8 durante a cultura primária. (A) A coluna representada pela cor preta mostra o número de nódulos de cartilagem encontrados em culturas da CNT que foram tratadas com FGF8 na concentração de 100 ng/mL durante a cultura primária, enquanto a coluna representada em branco mostra o número de nódulos de cartilagem identificados em culturas da CNT que não receberam o tratamento com FGF8 durante a cultura primária. (B) A coluna representada pela cor preta mostra a frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem em culturas da CNT que foram tratadas com FGF8 na concentração de 100 ng/mL durante a cultura primária, enquanto a coluna representada em branco mostra a frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem em culturas da CNT que não receberam o tratamento com FGF8 durante a cultura primária. Dados obtidos de dois experimentos independentes com  $n=28$  para todas as condições. \*  $P \leq 0,01$ ; \*\*  $P \leq 0,001$  e \*\*\*  $P \leq 0,0001$ ). Fonte: Própria autora.

## 5.2 O TRATAMENTO COM FGF8 FAVORECE A EXPRESSÃO DE GENES PRÓ-CARTILAGEM NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL.

A análise bioinformática do transcriptoma possibilitou a visualização de um panorama geral de genes que foram expressos entre cada uma das três amostras de células (triplicatas), tratadas ou não tratadas com FGF8 durante o período de migração. No total, foram obtidos 971 genes, destes, 511 mostraram-se regulados positivamente sob tratamento com FGF8 e 460 regulados negativamente sob o mesmo tratamento. É importante ressaltar que dentre os 971 genes, 195 genes detectados ainda não haviam sido descritos na espécie comparada (*C. coturnix japonica*) ou podem ter sido um produto de erro do sistema utilizado, ou seja, correspondiam a genes não atribuídos.

Dentre o total de genes acessados pela análise do transcriptoma, 14 foram validados na literatura demonstrando relação previamente conhecida com o desenvolvimento da CN e posterior obtenção de cartilagem a partir destas células. Importante ressaltar que estes 14 genes encontravam-se regulados positivamente sob tratamento com FGF8, ou seja, o fator de crescimento estava de alguma forma promovendo a expressão destes genes. Com a finalidade de facilitar o tratamento e interpretação dos dados, os genes selecionados foram setorizados em três diferentes categorias: 1) genes de borda de placa neural e especificadores da crista neural, 2) genes da crista neural migratória e 3) genes relacionados com diferenciação condrocítica. Os genes que compõem cada uma das categorias encontram-se listados na Tabela 2.

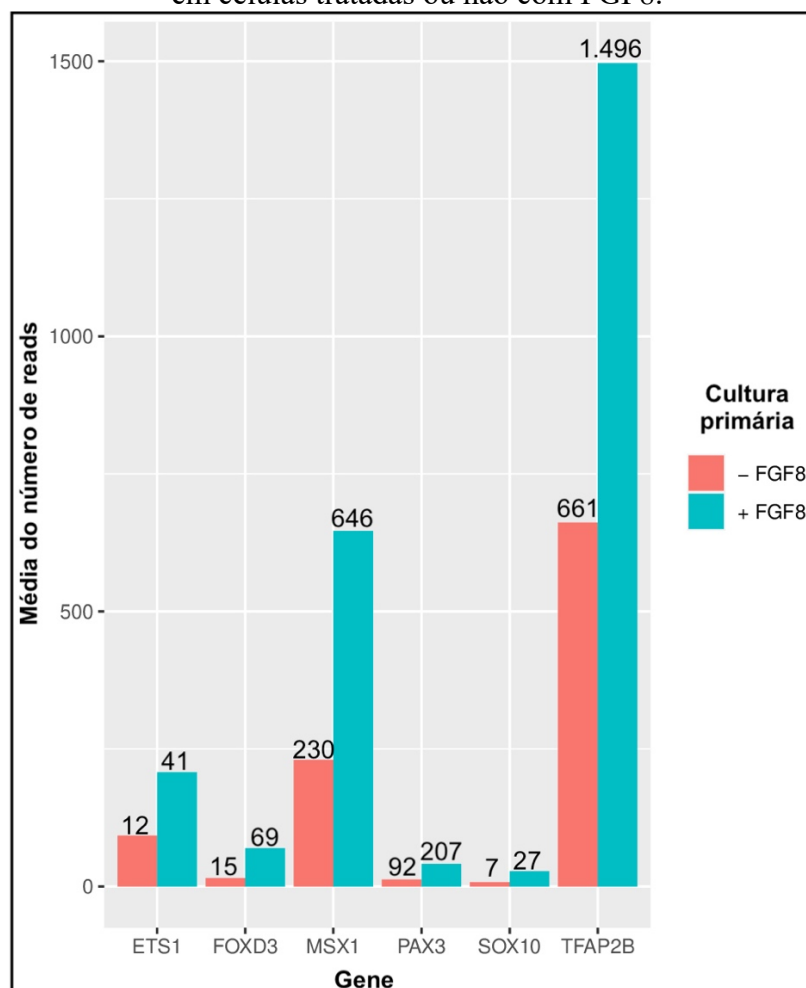
Tabela 2 – Categorias de genes validados na literatura.

Genes de BPN e especificadores da CN	Genes da CN migratória	Genes relacionados com diferenciação condrocítica
<i>Ets1</i>	<i>FoxD3</i>	<i>Colla2</i>
<i>FoxD3</i>	<i>Msx2</i>	<i>Col2a1</i>
<i>Msx1</i>	<i>Sox10</i>	<i>Map2K3</i>
<i>Pax3</i>	<i>Sox9</i>	<i>Sox9</i>
<i>Sox10</i>		
<i>Tfap2B</i>		

Fonte: Própria autora.

Primeiramente, serão apresentados os resultados referentes aos genes de BPN e especificadores de CN. A média do número de *reads* entre as triplicatas tratadas ou não com FGF8, demonstra que todos os genes selecionados nesta categoria possuem um maior número absoluto de *reads* nas células da CNT tratadas com FGF8. Resultado demonstrado através de um gráfico de expressão (Figura 18). O gene *Tfap2B* destaca-se dentre os demais, uma vez que nas células tratadas com FGF8, o número de *reads* é aproximadamente duas vezes maior, no entanto, todos os outros genes apresentam o número de *reads* aumentado em pelo menos uma vez sob tratamento com FGF8.

Figura 18 - Análise de expressão de genes de Borda de Placa Neural e especificadores de CN em células tratadas ou não com FGF8.

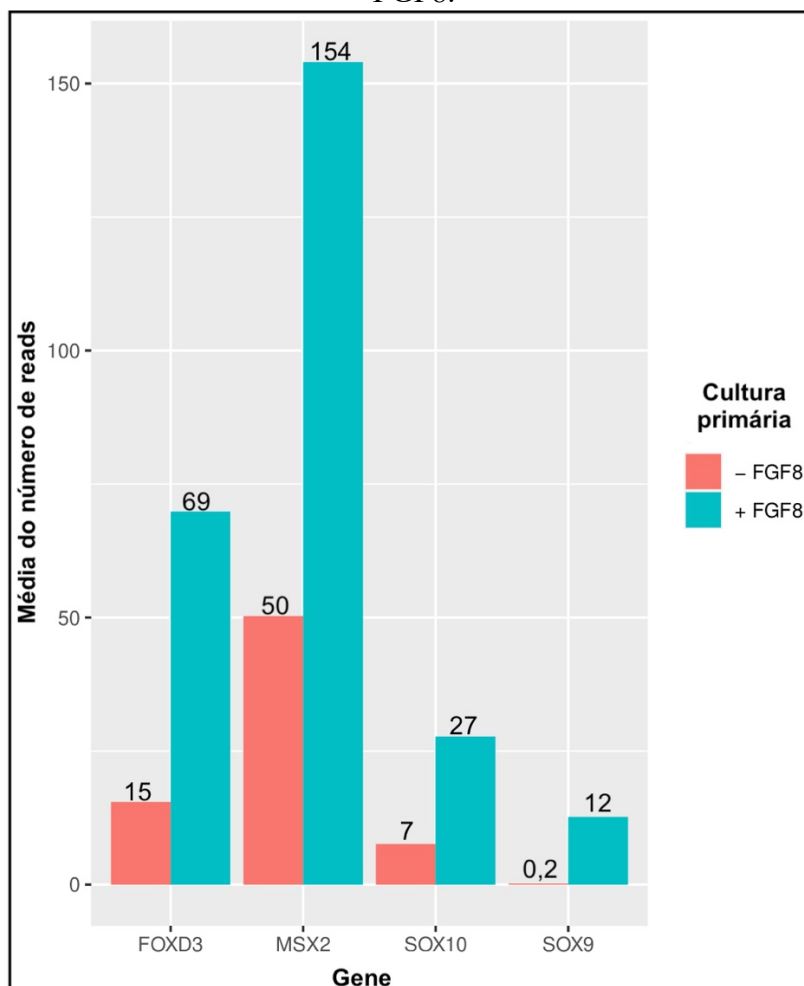


Representação gráfica da expressão de genes de BPN e especificadores de CN entre células tratadas ou não com FGF8 durante a cultura primária, demonstrada através do número absoluto

de *reads*. A média de *reads* para cada um dos genes é informada acima das respectivas barras no gráfico. Fonte: Própria autora.

Em seguida, são apresentados os resultados obtidos a partir da análise de expressão de genes selecionados da CN migratória. Novamente, todos os genes apresentados estão regulados positivamente sob tratamento com FGF8. A média do número de *reads* nas células tratadas representa um aumento de mais de uma vez para todos os genes, sendo que *Msx2* teve sua expressão aumentada duas vezes. Nota-se a expressão de *Sox9*, que apesar de ser relativamente baixa em ambas as condições, sofre um aumento na ocasião em que as células da CNT recebem o tratamento com FGF8 (Figura 19).

Figura 19 – Análise de expressão de genes de CN migratória em células tratadas ou não com FGF8.

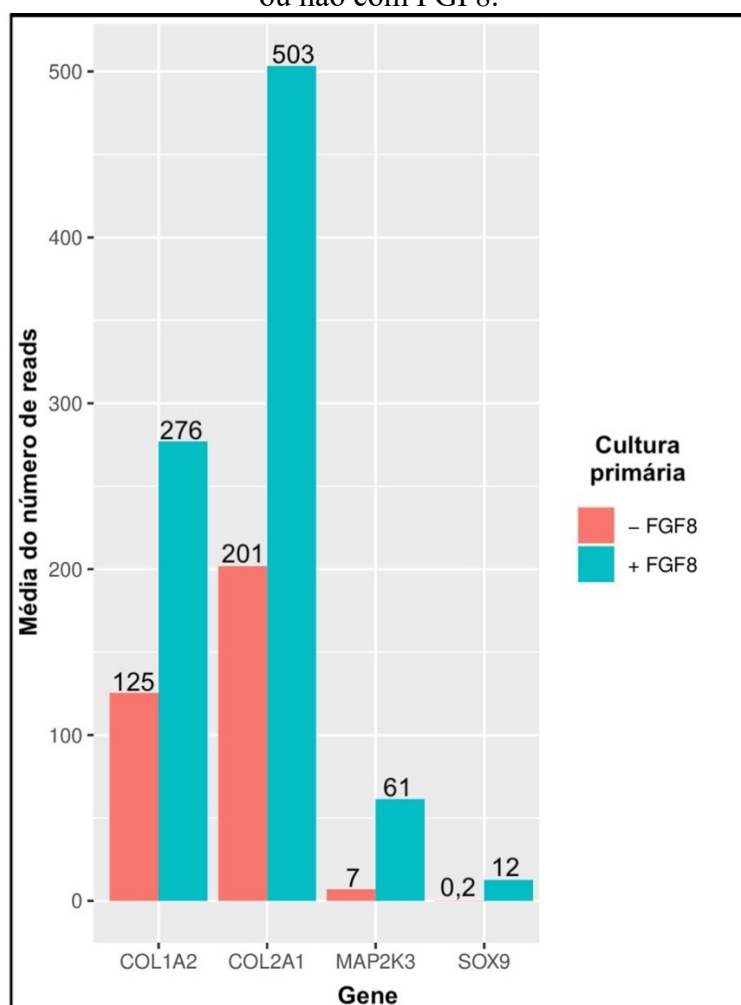


Representação gráfica da expressão de genes de CN migratória entre células tratadas ou não com FGF8 durante a cultura primária, demonstrada através do número absoluto de *reads*. A

média de *reads* para cada um dos genes é informada acima das respectivas barras no gráfico. Fonte: Própria autora.

Finalmente, trataremos dos resultados obtidos a partir da análise dos genes selecionados que estão relacionados com a diferenciação condrocítica a partir das células da CNT. Todos os genes sofreram um aumento de expressão de pelo menos uma vez nas células da CNT que foram tratadas com FGF8 (Figura 20).

Figura 20 - Análise de expressão de genes de diferenciação condrocítica em células tratadas ou não com FGF8.



Representação gráfica da expressão de genes de diferenciação condrocítica a partir das células da CN entre células tratadas ou não com FGF8 durante a cultura primária, demonstrada através do número absoluto de *reads*. A média de *reads* para cada um dos genes é informada acima das respectivas barras no gráfico. Fonte: Própria autora.

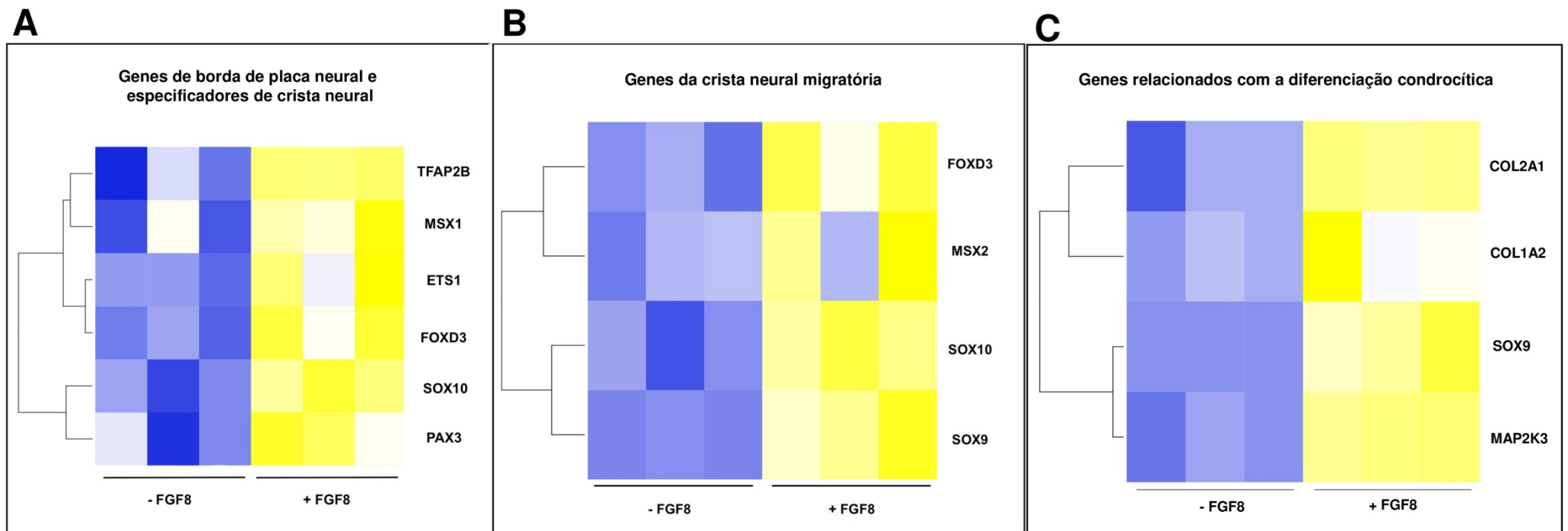


A fim de entender a relação entre os 14 genes supracitados com o tratamento de FGF8 nas culturas primárias, também foram aplicadas correlações de Pearson, que medem o grau de correlação entre duas variáveis, neste caso, entre as células da CNT tratadas ou não com FGF8. As correlações de Pearson foram explicitadas em *heatmaps* ou mapas de calor, uma representação gráfica de dados que se refere às matrizes de valores individuais que são expressos por cores e tem o objetivo de analisar comparativamente a expressão dos genes de interesse (Figura 21).

O mapa de calor dos genes de borda de placa neural (BPN) e especificadores de CN (Figura 21A) mostrou a expressão diferencial dos genes entre as células da CNT que foram tratadas ou não com FGF8 durante a fase migratória, sendo eles: *Tfap2B*, *Msx1*, *Ets1*, *FoxD3*, *Sox10* e *Pax3*. Analisando de forma comparativa a expressão dos genes nas amostras tratadas ou não tratadas com FGF8, é possível constatar que nas células que não entraram em contato com FGF8, a expressão dos genes é mais baixa (representada na cor azul), enquanto que nas células tratadas com FGF8, essa expressão é mais alta (representada na cor amarelo).

O resultado se repete quando analisamos os genes de CN migratória (Figura 21B) – *FoxD3*, *Msx2*, *Sox9* e *Sox10* – e relacionados com a diferenciação condrocítica (Figura 21C) - *Colla2*, *Col2a1*, *Map2K3* e *Sox9*.

Figura 21 - Análise de mapa de calor da expressão diferencial entre células tratadas ou não tratadas com FGF8.



Gráficos de análise de mapa de calor ou *heatmap*. As triplicatas são divididas em amostras que receberam (+ FGF8) ou não (- FGF8) o tratamento com FGF8. A cor azul representa uma expressão menor em relação à cor amarela. Fonte: Própria autora.

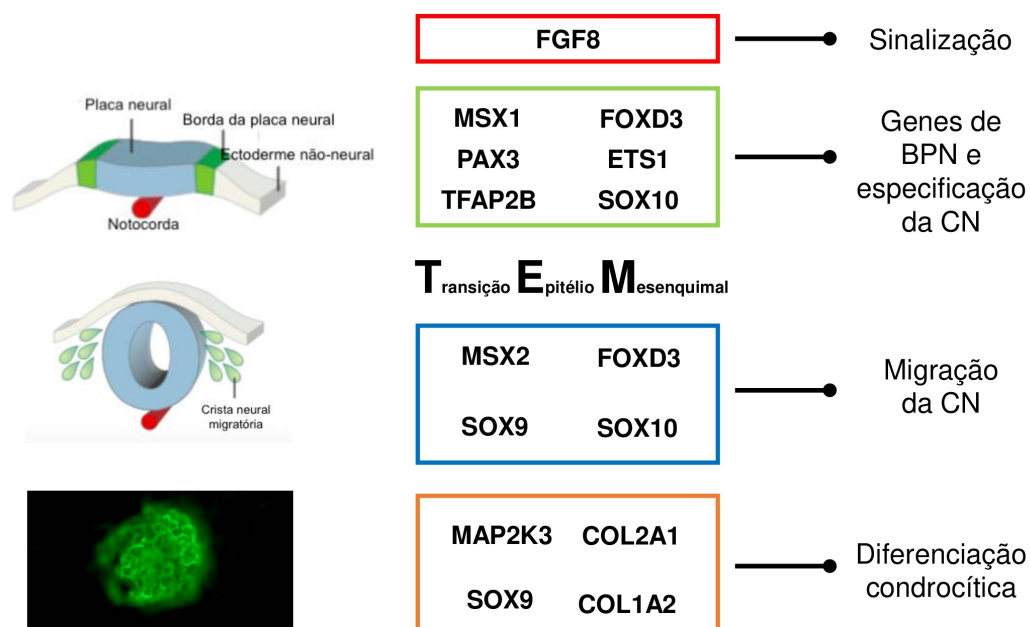
## 6 DISCUSSÃO

Anterior à sua emigração a partir do tubo neural (TN), as células da Crista Neural (CN) são formadas por progenitores que apresentam duas características extremamente relevantes: multipotência e heterogeneidade. Embora existam trabalhos controversos, que apontam para a pré-determinação da CN (KRISPIN et al., 2010), a teoria mais aceita é de que as células da CN não estão pré-determinadas aos seus destinos celulares antes da sua migração pelo embrião, ao contrário, são multipotentes *in vivo* desde a sua fase pré-migratória (BAGGIOLINI et al., 2015). Apesar de a CN de todos os níveis axiais do embrião serem dotadas de multipotencialidade, a CNT possui um potencial de desenvolvimento restrito quando comparada à CNC. As células da CNT são capazes de originar células gliais, neurônios e melanócitos, mas incapazes de dar origem a derivados ectomesenquimais *in vivo*, como condrócitos, osteócitos e adipócitos, na grande maioria dos animais vertebrados. No entanto, diversos grupos de pesquisa já demonstraram que a CNT possui o potencial ectomesenquimal latente que embora não possa ser observado *in vivo*, é capaz de ser evidenciado através de condições experimentais permissivas e/ou estimulantes para o desenvolvimento destes progenitores (CALLONI et al., 2007; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013; MCGONNELL; GRAHAM, 2002).

Este é o primeiro trabalho que se tem registro, que se devota ao estudo da rede gênica-regulatória das células da CNT migratória, comparando a expressão dos genes expressos em duas condições distintas: sob tratamento ou não com o morfógeno FGF8. Os trabalhos antecessores a este apresentaram a rede gênica-regulatória a partir da CNC, por este motivo, ao decorrer do texto serão evocados aspectos de regulação transcricional da CNC para discutir os resultados obtidos a partir da análise do transcriptoma das células da CNT.

Os genes identificados a partir da análise transcriptômica foram setorizados obedecendo uma sequência lógica de acontecimentos do desenvolvimento muito bem orquestrada pelas células da CN. Assim, começaremos com a formação da borda da placa neural, especificação das células da CN e sua posterior migração, e finalmente, abordaremos genes envolvidos no processo de diferenciação condrocítica a partir destas células (Figura 22).

Figura 22 - Expressão de genes acompanhando os diversos passos do desenvolvimento das células da Crista Neural Troncal sob tratamento com FGF8.



Representação dos genes observados na análise transcriptômica que são expressos em diferentes momentos do desenvolvimento da CN. (A) Imagem representativa da BPN, entre a ectoderme neural e não neural, onde começam a ser expressos os primeiros genes indutores e especificadores de CN; (B) Imagem representativa do fechamento do TN e consequente delaminação e migração das células da CN; (C) Imagem obtida de análise imunocitoquímica através do anticorpo Sulfato de Condroitina. A imagem mostra um nódulo característico de cartilagem – agrupamento de células da CN diferenciadas, obtido em cultivo celular; (D) Representação de diferentes subcircuitos que formam o módulo regulatório responsável por direcionar as células da CNT à diferenciação cartilaginosa a partir do tratamento com FGF8, neste caso, a molécula sinalizadora. Fonte: Adaptado de (CALLONI et al., 2007; SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015).

## 6.1 FGF8 MANTÉM A MULTIPOTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL

Para que a diferenciação celular ocorra – neste caso, a diferenciação condrocítica, as células da CN devem manter um delicado balanço entre proliferação e multipotencialidade, esse balanço é em parte controlado pela expressão de receptores para múltiplos ligantes instrutivos,

de modo que a restrição progressiva de um progenitor envolve a perda também progressiva, de alguns de seus receptores. Dessa forma, pode-se dizer que conforme sua migração pelo corpo do embrião, as células da CN vão substituindo receptores e conseqüentemente tornam-se menos responsivas a um subconjunto de sinais. Essa perda de responsividade atua em combinação com os fatores de transcrição, que presentes no interior das células regulam os genes alvo para que sejam gerados os tipos celulares diferenciados (KELSH, 2006).

A presença de FGF8 embebido nas culturas primárias da CNT regula positivamente genes associados à manutenção da multipotencialidade celular, como *FoxD3* e *Sox10* (PERERA; KEROSUO, 2021), evidenciando que anterior às contribuições na diferenciação celular propriamente dita, FGF8 pode estar mantendo as células em um estado de *stemness*, em outras palavras, conservando as células com uma identidade mais embrionária e conseqüentemente, com uma gama maior de potencialidades a seu dispor.

A função de *FoxD3* no desenvolvimento da CN é multifacetada e conservada em diversas espécies animais, como galinha, camundongo, sapo e peixe-zebra, onde *FoxD3* é expresso nas células pré-migratórias e migratórias iniciais de todos os níveis axiais do embrião (LISTER *et al.*, 2006; MUNDELL; LABOSKY, 2011; SIMÕES-COSTA *et al.*, 2012). No entanto, assim que a migração destas células inicia, a expressão de *FoxD3* sofre uma redução, sugerindo o papel deste gene na manutenção da multipotencialidade celular (KHUDYAKOV; BRONNER-FRASER, 2009). Um estudo realizado em peixe-zebra, visando caracterizar a paisagem transcricional e epigenética das células da CN expressando *FoxD3*, demonstra que este fator de transcrição é capaz de modificar a organização da cromatina, permitindo que a maquinaria transcricional acesse sítios necessários para a transcrição de genes relacionados com a especificação da CN e a manutenção de seus programas de célula-tronco. Além disso, *FoxD3* também atua como um repressor para modular as escolhas de destinos celulares durante o estágio migratório inicial da CN, novamente, mantendo a multipotencialidade celular (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2016).

Com a criação de camundongos transgênicos utilizando o sistema Cre-Lox, uma tecnologia de edição gênica onde a enzima *Cre recombinase* é capaz de reconhecer e provocar a deleção de regiões do DNA flanqueadas por *LoxP*, constatou-se mais uma vez que a presença de *FoxD3* é essencial para manter os progenitores indiferenciados das células da CN (TENG *et al.*, 2008). Os camundongos mutantes, que tiveram a região do DNA que codifica *FoxD3* deletada, apresentaram falhas severas na formação de derivados da CN, como os derivados dos

arcos branquiais, sistema nervoso periférico e entérico, além de defeitos sutis na CN cardíaca. Juntos, os dados deste trabalho sugerem que a especificação inicial da CN pode ocorrer sem maiores problemas na ausência de *FoxD3*, mas que sem a expressão deste gene há uma dificuldade severa na manutenção dos progenitores da CN. A perturbação na manutenção dos referidos progenitores resulta na perda de estruturas derivadas da CN e concomitantemente, na diminuição de genes específicos dessas células, como *Sox10* (TENG *et al.*, 2008), que também é um gene importante para a manutenção da multipotencialidade nas células da CN (BRITSCH *et al.*, 2001).

Não apenas *Sox10*, mas todos os genes da subclasse Sox E - que inclui *Sox8*, *Sox9* e *Sox10* - são importantes para diferentes passos de diferenciação da CN (WEIDER; WEGNER, 2017). Experimentos realizados em embriões de rato utilizando as células da CNT no dia embrionário 10,5 demonstram que *Sox10* exerce um efeito paradoxal nessas células, pois ao mesmo tempo em que mantém o potencial de linhagem neural, inibe ou atrasa a diferenciação neuronal, demonstrando seu importante papel na manutenção da multipotencialidade da CNT, retendo-as em um estado intermediário (KIM *et al.*, 2003). Dados obtidos a partir de experimentos utilizando rato e peixe-zebra como modelos animais demonstraram que na ausência de *Sox10* a indução das células da CN pode ocorrer, muito provavelmente devido à ação dos demais membros do grupo SoxE. No entanto, a multipotência da CN é afetada, uma vez que a expressão de determinados receptores dependentes de *Sox10* estão ausentes e a ausência de receptores ocasiona a falha na ativação de genes específicos de diferenciação, de forma que as células permanecem em um estado indiferenciado até a apoptose (BRITSCH *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2003; STEMPLE'; ANDERSON', 1992).

Demonstrou-se que o tratamento com FGF8 em culturas de células provenientes de arcos mandibulares de camundongo pode sustentar o status de progenitor e a diferenciação em múltiplos tipos celulares (SHAO *et al.*, 2015). O trabalho realizado por Da Costa e colaboradores (2018) corrobora este resultado, demonstrando que a administração de FGF8 e Sonic Hedgehog, duas moléculas essenciais para o desenvolvimento dos derivados craniofaciais, agem em conjunto nas culturas clonais de células da CNC, promovendo a sobrevivência e/ou manutenção da multipotencialidade de progenitores dotados de potencial ectomesenquimal (DA COSTA; TRENTIN; CALLONI, 2018). Com isso, hipotetizamos que a ação de FGF8 nas células da CNT seja semelhante ao que se observa a partir das células da CNC, onde as células respondem ao FGF8 de formas distintas a depender do momento do

desenvolvimento embrionário. Com o tratamento de FGF8 durante o período migratório das células da CNT, o morfógeno pode estar atuando de forma a promover a sobrevivência de progenitores específicos, dotados de potencialidade ectomesenquimal. Além disso, pode estar mantendo a multipotencialidade destes progenitores, permitindo que permaneçam em um estado de *stemness* por mais tempo, até que encontrem um ambiente permissivo no qual possam desenvolver plenamente seu potencial condrogênico.

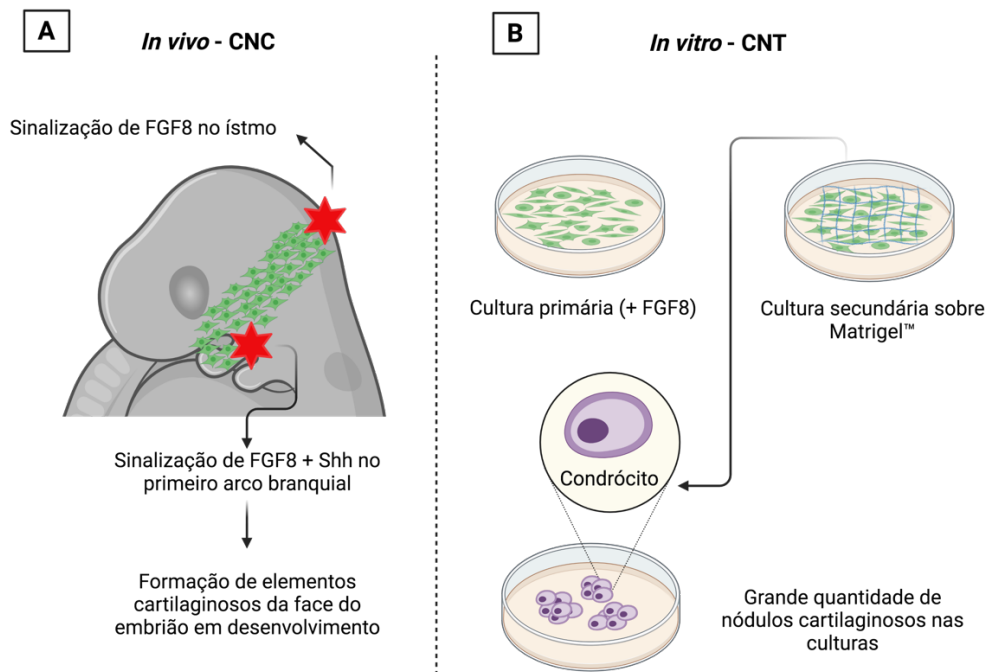
O estudo realizado por Shao e colaboradores (2015), demonstra que a superexpressão de FGF8 não contribui com o aumento da migração e proliferação das células da CNC (SHAO *et al.*, 2015). Com isso, hipotetizamos que o aumento no número de nódulos cartilagosos observado nas culturas tratadas com FGF8 não é um mero produto de mais células proliferando. Em vez disso, consideramos que o tratamento com FGF8 nas células da CNT esteja agindo sobre a sobrevivência de progenitores específicos que são mais responsivos ao morfógeno, a saber, aqueles progenitores dotados de potencial ectomesenquimal. Essa maior responsividade ao FGF8 pode ser um resultado da expressão diferencial de alguns receptores na superfície celular destes progenitores específicos. De fato, o trabalho realizado por Trumpp e colaboradores (1999) demonstra que a inativação de *Fgf8* em embriões de camundongo em desenvolvimento resulta em um grande número de células apoptóticas no primeiro arco branquial, estando sua atividade relacionada com a sobrevivência das células da CN (TRUMPP *et al.*, 1999). Aliada à esta sobrevivência, o tratamento com FGF8 pode estar mantendo a multipotencialidade das células por mais tempo. Dessa forma, quando submetidas a um ambiente permissivo nas culturas secundárias realizadas sobre Matrigel<sup>TM</sup>, a circuitaria gênica de condrogênese permanece amplificada e muito bem estabelecida. Juntas, estas hipóteses podem explicar o porquê de observarmos um número e uma frequência de nódulos cartilagosos expressivos nas células da CNT que foram tratadas com FGF8 durante o período de migração e cultivadas sob Matrigel<sup>TM</sup> na fase de cultura secundária.

Finalmente, convido o leitor a me acompanhar em uma breve extrapolação para compararmos de forma básica o que acontece *in vivo* nas células da CNC, com o que acreditamos estar acontecendo *in vitro*, em nossas culturas de CNT sob tratamento com FGF8 (Figura 23). Conforme mencionado na Introdução, as células da CNC estão em contato com o FGF8 secretado pelo ístmo já nos momentos iniciais de delaminação a partir do TN. Após esta sinalização, importante para a manutenção da multipotencialidade e regulação negativa de *Hoxa2* pelas células da CNC, elas percorrem seu caminho até o primeiro arco branquial.

Novamente, a CNC entra em contato com FGF8 no primeiro arco branquial, que aliado à sinalização de Shh, promove um ambiente propício para que a CNC até então multipotente, adote um caminho de diferenciação condrocítica para a construção dos elementos cartilagosos da face do embrião em desenvolvimento (ABU-ISSA et al., 2002; ABZHANOV; TABIN, 2004; TUCKER et al., 1999) (Figura 23A).

Um processo semelhante parece estar acontecendo em nossas culturas de CNT tratadas com FGF8. O tratamento com o morfógeno nas culturas primárias atua promovendo a sobrevivência de progenitores ectomesenquimais e mantendo-os em um estado de multipotencialidade. Na cultura secundária, estes progenitores encontram um ambiente permissivo – o substrato Matrigel™ – para a diferenciação condrocítica e formação de nódulos cartilagosos (Figura 23B).

Figura 23 - Efeito da sinalização de FGF8 *in vivo* - CNC e *in vitro* - CNT.



Representação comparativa entre o efeito de FGF8 no microambiente *in vivo* das células da CNC e *in vitro* nas culturas de células da CNT. Em ambos os casos, a sinalização de FGF8 no período migratório das células da CN tem a função de manter os progenitores ectomesenquimais em um estado de multipotencialidade, até que encontrem seu destino final e em um ambiente propício, possam eleger o caminho de diferenciação condrocítica. Observação: Esta é uma figura de caráter meramente ilustrativo, o estágio de desenvolvimento do embrião, bem como as rotas de migração da CN não foram levados em consideração. Fonte: Própria autora.



## 6.2 GENES DE BORDA DE PLACA NEURAL E ESPECIFICADORES DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8

O primeiro passo na formação das células da CN é o estabelecimento da borda da placa neural (BPN), um território composto por células multiprogenitoras que se localiza durante a gastrulação entre os tecidos de domínio neural e epidermal. A BPN pode sofrer diferentes processos de especificação, resultando em diferentes tipos celulares, inclusive as células da CN (NIKITINA; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Os níveis de expressão dos genes de BPN influencia o destino celular adotado por estas células (HONG; SAINT-JEANNET, 2007), assim, a fronteira entre a placa neural e a BPN resulta de interações inibitórias entre genes de assinatura neural e não-neural. Portanto, se genes da BPN como *Tfap2a* e *Msx1* forem expressos no domínio de placa neural, genes neurais são regulados negativamente. O contrário também é verdadeiro, a inibição de genes de BPN amplifica o domínio de expressão de genes neurais, como *Sox2/3* (LUO et al., 2002; PIEPER et al., 2012).

Para que as células da BPN acabem adotando um destino de CN, faz-se necessária a expressão de genes especificadores, que possuem funções chaves em conferir as células da BPN assinaturas de CN, como por exemplo, a ativação de efetores da transição epitélio mesenquimal (TEM) que confere à CN a capacidade migratória. Além disso, os especificadores de CN são capazes de se regular mutuamente de forma positiva, mantendo as células da CN em um estado indiferenciado durante a sua especificação e posterior migração (NIKITINA; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Resumindo, os genes especificadores de CN conferem à estas células suas duas principais características: capacidade migratória e estado de multipotência.

O trabalho realizado por Khudyakov e Bronner-Fraser (2009) apresentou uma análise temporal da expressão de genes iniciais na CN em embriões de galinha. As pesquisadoras demonstraram que genes de BPN como *Pax3/7* e *Msx1* permanecem expressos nos progenitores da CN, sugerindo sua importância na indução de genes especificadores destas células. Um dos primeiros especificadores a serem expressos na CN são *FoxD3*, *Ets1* e *Snail1/2* (KHUDYAKOV; BRONNER-FRASER, 2009). De fato, a expressão do subcircuito *Msx1* e *Pax3/7* é indispensável para a expressão de genes como *FoxD3* e *Ets1*, este último também dependente da expressão de *Tfap2b* (BAREMBAUM; BRONNER, 2013; SIMÕES-COSTA et

al., 2012), enquanto que a sinalização de *FoxD3* em camundongos é necessária para a expressão de *Sox10*, também envolvido na especificação da CN (DOTTORI et al., 2001), sendo FGF8 suficiente para induzir a expressão de *FoxD3* (MONSORO-BURQ; FLETCHER; HARLAND, 2003). A expressão de *FoxD3*, *Ets1* e *Tfap2b* estão interconectadas no processo de desenvolvimento de BPN e especificação das células da CNT. O presente trabalho revela que a média do número de fragmentos de RNAm observados para estes três genes aumenta nas células da CNT tratadas com FGF8 durante a fase migratória. A diferença de expressão mais notável encontra-se no gene *Tfap2b*, uma vez que o número de 661 *reads* detectados nas culturas não tratadas com FGF8, aumenta para 1.496 nas culturas que recebem o tratamento. Este gene regula diretamente a expressão de *Ets1*. Não há trabalhos disponíveis na literatura que demonstrem a regulação direta que FGF8 exerce sobre *Tfap2b*, no entanto, através dos dados de análise transcriptômica, propomos que a sinalização de FGF8 esteja agindo, direta ou indiretamente, sobre a expressão deste gene.

Sob o tratamento com FGF8, encontram-se regulados positivamente outros dois genes associados à identidade de BPN e atuantes na posterior especificação da CN, sendo eles *Msx1* e *Pax3*. Diferentes contribuições na literatura confirmam que tanto *Msx1* quanto *Pax3*, são regulados positivamente por *Fgf8* (GARNETT; SQUARE; MEDEIROS, 2012; MONSORO-BURQ; FLETCHER; HARLAND, 2003; MONSORO-BURQ; WANG; HARLAND, 2005). Essa observação é confirmada pelo presente trabalho. Apesar de não se tratar de uma diferença significativa do ponto de vista estatístico, a média do número de fragmentos de RNAm detectados para *Msx1* é de 230 para as células não tratadas com FGF8, e 646 para as células que receberam o tratamento. Enquanto isso, a média dos transcritos de *Pax3* aumenta de 92 para 207 nas culturas celulares que receberam o tratamento com o morfógeno.

Nesse aspecto, é muito interessante o trabalho de Garnett e seu grupo de pesquisa (2012), que demonstraram em peixe-zebra que a expressão de *Fgf*, *Bmp* e *Wnt* são essenciais para a expressão de *Pax3* (GARNETT; SQUARE; MEDEIROS, 2012). Adicionalmente, foi demonstrado em *Xenopus leavis*, que dentre os *Fgfs* conhecidos, *Fgf8* satisfaz diferentes condições para ser considerado um especificador de CN. Primeiro, ele é expresso em tecidos com potencial indutor de CN logo no início do desenvolvimento embrionário, ainda no estágio de nêurula. Segundo, a sua atividade é indispensável para que a CN se forme. O trabalho demonstra que a atividade do gene *Fgf8* é necessária para mediar a indução da CN através de outros genes também importantes nesta etapa, como *FoxD3* e *Slug*. Finalmente, *Fgf8* é capaz

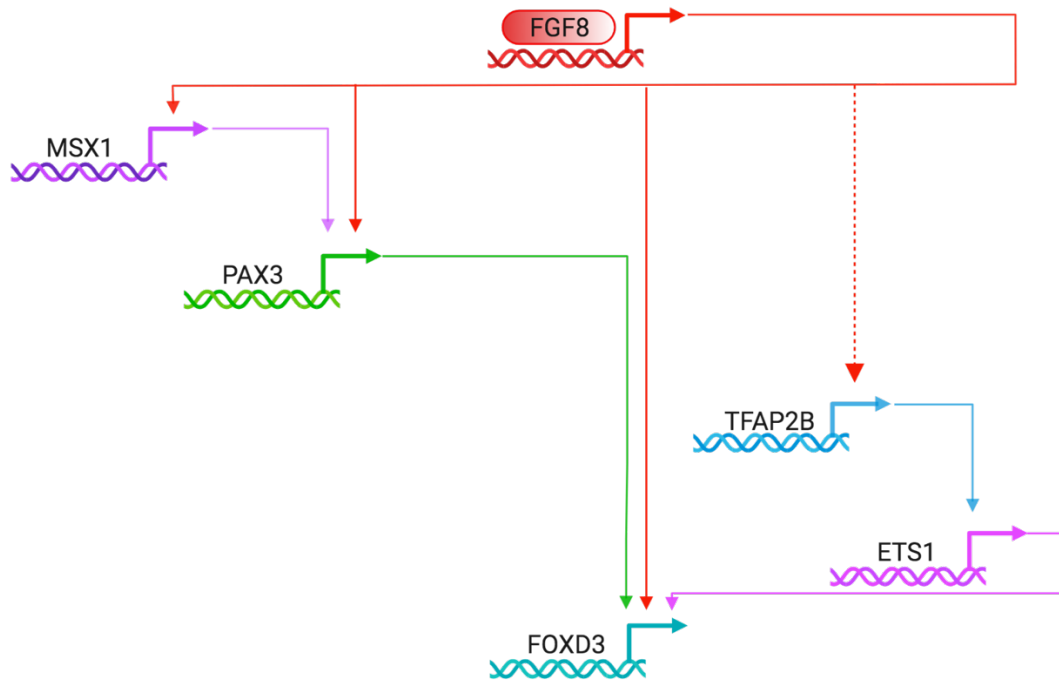
de sinergizar com outras moléculas – como Noggin ou Chordin, uma propriedade muito importante de indutores da CN, visto que no desenvolvimento embrionário muitas vezes a atividade de determinados genes são espaço e temporalmente transitórias, evocando a necessidade de outros fatores para manter e completar a indução de toda gama de marcadores da CN inicial (MONSORO-BURQ; FLETCHER; HARLAND, 2003). Os esforços do grupo em compreender a indução da CN continuaram e dois anos depois foi publicado um trabalho que demonstra que *Msx1* ativa diretamente a expressão de *Pax3* durante a fase de indução da CN. A relação destes dois genes está completamente imbricada com *Fgf8*, uma vez que este induz a CN através da sinalização de *Msx1* e *Pax3* (MONSORO-BURQ; WANG; HARLAND, 2005). A superexpressão de *Fgf8* no estágio de duas a quatro células em *Xenopus* com a injeção de mRNA, evidenciou que este gene regula de forma positiva e robusta a expressão de *Msx1* na área injetada. Seu papel na ativação de *Pax3* é menos óbvio, mas, necessário para que *Fgf8* possa proceder com a ativação de outros genes importantes para a indução da CN, como *Slug* (MONSORO-BURQ; WANG; HARLAND, 2005). Assim, o grupo demonstra em dois trabalhos consecutivos que dentre diferentes candidatos, *Fgf8* atende diversos requisitos para ser considerado um indutor de CN e que a ativação de *Msx1* e *Pax3* são necessárias tanto para que *Fgf8* possa induzir a CN, quanto ativar a expressão de genes igualmente importantes para essa etapa do desenvolvimento.

Além de *FoxD3* e *Ets1*, um outro gene associado à especificação da CN que se encontra regulado positivamente sob tratamento com FGF8 é *Tfap2b*. A família dos fatores de transcrição AP2 – da qual *Tfap2b* faz parte – é composta por proteínas de ligação ao DNA evolutivamente bem conservadas que estão implicadas majoritariamente no desenvolvimento da região cranial dos vertebrados, sendo que além de especificadores, esses genes também são expressos na CN migratória (HILGER-EVERSHEIM *et al.*, 2000). Embriões de camundongo e humanos com mutação no gene *Tfap2b* apresentam mal formação no epitélio renal, por conta da apoptose excessiva. Além disso, perturbações neste gene estão relacionadas com a Síndrome de Char, uma neurocristopatia (condição decorrente de falhas no desenvolvimento dos derivados da CN) onde os pacientes apresentam anormalidades faciais, incluindo o aumento da largura entre os olhos e uma condição cardíaca chamada de duto arterioso patente (CHAZAUD *et al.*, 1996; SATODA *et al.*, 2000). Um estudo realizado em peixe-zebra demonstra que *Tfap2b* e *Tfap2a* possuem efeitos redundantes na formação craniofacial destes animais. A utilização de morfolidos para bloquear a expressão de *Tfap2b* demonstrou que a interrupção de sua atividade

causa efeitos semelhantes da depleção de *Tfap2a*. Quando o morfolino para bloqueio de *Tfap2b* é injetado em embriões selvagens, as estruturas craniofaciais são preservadas no estágio de desenvolvimento de 72 horas após a fertilização. Este resultado contrasta com a injeção do morfolino para *Tfap2b* em embriões com a expressão de *Tfap2a* previamente depletada, causando defeitos craniofaciais severos na mandíbula dos embriões e nos arcos hióide e branquial (KNIGHT et al., 2005). Os componentes posteriores do neurocrânio e os esqueletos da nadadeira peitoral, ambos derivados do mesoderma, aparecem inalterados, sugerindo que *Tfap2b* e *Tfap2a* possuem efeitos redundantes no desenvolvimento de elementos esqueléticos derivados das células da CN (KNIGHT et al., 2005).

Em estudos da região cefálica de embriões de galinha, os transcritos de *Tfap2b* não são detectados antes do início da especificação da CN, quando o gene passa a ser robustamente expresso nessa linhagem de células (ROTHSTEIN; SIMOES-COSTA, 2020). Para confirmar a função de *Tfap2b* no desenvolvimento da CN, a inibição deste gene foi realizada em um momento inicial do desenvolvimento do embrião galináceo, anterior à formação de somitos. Como resultado, constatou-se que a ablação de *Tfap2b* não produziu efeitos na BPN e sim no programa de especificação da CN, diminuindo a expressão de genes especificadores da CN como *FoxD3*, *Ets1*, *Sox10* e *Sox9*. (ROTHSTEIN; SIMOES-COSTA, 2020). Cumpre ressaltar que os experimentos anteriores foram todos realizados na região cefálica do embrião. Dado que os genes supracitados de especificação da CNC encontram-se todos regulados positivamente sob tratamento com FGF8 no presente trabalho, incluindo *Tfap2b*, sugere-se que FGF8 atua promovendo os mesmos circuitos de especificação nas células da CNT em cultivo celular (Figura 24).

Figura 24 - Circuito de especificação da CNT em células tratadas com FGF8.



Representação esquemática do circuito de especificação da CNT. FGF8 atua promovendo a atividade de *Pax3*, *Msx1* e *FoxD3*. *Tfap2b* regula positivamente a expressão de *Ets1* que por sua vez, é capaz de desencadear a expressão de *FoxD3*. A linha tracejada representa uma proposta de interação transcritucional, não demonstrada previamente na literatura. Fonte: Própria autora.

### 6.3 DELAMINAÇÃO E MIGRAÇÃO DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8

Uma vez especificadas, as células da CN partem para o seu próximo passo no desenvolvimento dos vertebrados: a migração. Com o programa de especificação, estabelece-se a capacidade das células da CN de sofrerem a delaminação a partir do TN e adotarem rotas migratórias pelo corpo em desenvolvimento do embrião. Para que a delaminação possa ocorrer, faz-se necessário que as células abandonem seus atributos epiteliais e adotem características mesenquimais – entre elas, a capacidade de migrar (PIACENTINO; LI; BRONNER, 2020). Essa mudança de comportamento celular é alcançada através da transição epitélio mesenquimal (TEM). Muitos dos genes que controlam a migração da CN também são parte da maquinaria molecular que dirige a TEM, indicando que os subcircuitos de desenvolvimento da CN são

muito interligados entre si. O processo central da TEM é a perda de marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais, através da regulação das caderinas, proteínas adesivas que mantêm as células da CN justapostas (GHELDOLF; BERX, 2013). Estudos em embriões de galinha demonstraram que a delaminação da CN requer uma troca na expressão de caderinas, passando das caderinas do tipo 1, como caderina 1 (Ncad) e caderina 2 (Ecad) para caderinas do tipo 2, como caderina 7 e 11. Essa mudança de expressão permite que as junções aderentes das células sejam desfeitas e estas possam emigrar a partir do TN, uma vez que as caderinas do tipo 1 são mediadoras de interações fortes entre as células, garantindo a estabilização do epitélio (GHELDOLF; BERX, 2013).

Existem alguns genes protagonistas na regulação do processo de TEM, como *Slug* e *Snail*. No presente trabalho, ambos os genes não apresentam uma expressão diferencial entre células tratadas ou não com FGF8 (dados não mostrados). No entanto, a literatura demonstra que tratamento com FGF8 aumenta os níveis de expressão de *Sox9*, necessário para que *Snail* e *Slug* possam desempenhar seus papéis e levar as células da CNT à TEM (CHEUNG et al., 2005). A expressão forçada de *Snail* e *Slug* através da eletroporação *in ovo* destes genes em embriões de galinha não foi capaz de induzir a expressão de marcadores ectópicos da CNT e, além disso, as células permaneceram com atributos epiteliais, incluindo a expressão de genes de caderina do tipo 1, como Ncad. Por outro lado, quando a expressão forçada de *Snail* ou *Slug* é acompanhada pela expressão de *Sox9*, as células da CNT expressam HNK1, importante marcador ectópico da CN, e passam a adotar características mesenquimais, como redução na expressão de Ncad e constante migração celular a partir do TN (evidenciada pela presença do marcador HNK1) (CHEUNG et al., 2005). Uma vez que os circuitos regulatórios da CN são altamente interligados, Cheung e colaboradores (2005) investigaram o papel de *FoxD3* e *Sox10* em conjunto com o papel já demonstrado de *Sox9* no contexto da TEM. Com os mesmos experimentos de expressão forçada dos genes e posterior avaliação da presença de caderinas, demonstraram que *FoxD3* sozinho não é suficiente em promover a TEM, mas que sua expressão é capaz de inibir a expressão de Ncad. Esta observação corroborou resultados anteriores que apontaram o papel de *FoxD3* na inibição de Ncad e ativação da caderina 7, um tipo 2 de caderina (DOTTORI et al., 2001). Além disso, a presença de *FoxD3* induz a expressão de *Sox10*, um importante marcador que inicia a expressão de HNK1 nas células delaminantes da CNT e inibe a expressão de Ncad (CHEUNG et al., 2005). Juntos, os trabalhos demonstraram que a ação combinatória de *Sox9*, *Sox10* e *FoxD3* – todos regulados positivamente sob tratamento com

FGF8 no presente trabalho – é suficiente para conferir à CNT atributos celulares relacionados com a delaminação, como a expressão de HNK1, regulação negativa de caderinas do tipo 1 e regulação positiva de caderinas do tipo 2.

Uma vez completa a delaminação das células a partir do TN, a CN migratória começa a sofrer alterações na sua dinâmica gênico-regulatória, passando a expressar fatores de transcrição relacionados com o processo de migração e iniciando programas de diferenciação cujo destino final é a formação de seus respectivos derivados (SZABÓ; SZABÓ; MAYOR, 2018). Do ponto de vista regulatório, a fase migratória das células da CN é de certa forma conturbada, uma vez que estas células entram em contato com uma miríade de moléculas sinalizadoras durante sua invasão pelo corpo do embrião e em resposta às sinalizações, começam a ser disparados subcircuitos para diferenciação em diversos tipos celulares (SZABÓ; SZABÓ; MAYOR, 2018). Conseqüentemente, estudar esta população de células torna-se uma tarefa laboriosa, pois como as células migratórias misturam-se com células já em processo de diferenciação, é desafiador isolar uma população pura de células migratórias da CN.

Uma técnica comumente empregada na tentativa de isolar populações puras da CN é a utilização de células positivas para biomarcadores específicos da CN, como *Sox10*. Assim, através de um ensaio imunocitoquímico, distingue-se as células positivas para *Sox10* e estas são isoladas para posterior utilização nos mais diversos experimentos com a CN (YANG et al., 2020). Nesse contexto, uma análise transcriptômica feita em células migratórias da CNC positivas para *Sox10* ampliou muito o conhecimento acerca dos fatores de transcrição relacionados com a migração, listando 50 genes que são enriquecidos na CNC migratória quando comparados com o embrião inteiro. Destes 50 genes, apenas 14 (aproximadamente 15% a 20%) eram previamente estudados no contexto de formação da CN ou integravam vias de sinalizações relacionadas com este processo, de acordo com dados anteriores publicados na literatura (SIMÕES-COSTA et al., 2014). Destes 14 genes, 5 foram encontrados regulados positivamente sob o tratamento com FGF8 na tabela de análise transcriptômica obtida a partir dos transcritos do presente trabalho, sendo eles *Ets1*, *FoxD3*, *Sox10* e *Tfap2b*, evidenciando que a CNC e CNT compartilham alguns reguladores transcricionais importantes para o processo migratório das células. Permanece em aberto a tarefa de escrutinar o papel individual dos novos genes descobertos no trabalho realizado por Simões-Costa (2014) e compreender sua participação no contexto de formação da CNC para que possa ser estabelecida uma rede gênico-regulatória com estes novos atores do processo de migração.

Um estudo realizado por Betancur e colegas (2010) constatou que a maioria dos fatores de transcrição envolvidos na especificação das células da CN continuam expressos durante a sua migração, sendo importantes inclusive para a regulação de outros genes relacionados com a migração das células. A análise cis-regulatória de um importante gene envolvido com a migração da CN, *Sox10*, em embriões de galinha revelou que sua atividade na CNC migratória é mediada pelo intensificador *Sox10E2*, que é diretamente regulado por genes especificadores da CN como *Myb*, *Ets1* e *Sox9* (BETANCUR; BRONNER-FRASER; SAUKA-SPENGLER, 2010). Estas observações são consistentes com resultados que colocam *Ets1* e *Sox9* como reguladores cruciais do módulo de migração da CNC, de forma que a ablação da expressão destes dois genes na região cefálica de embriões de galinha causa a perda de expressão de vários genes normalmente expressos pela CNC, como *Lmo4*, *RxrG* e *Ltk* (SIMÕES-COSTA et al., 2014).

Nossa análise dos transcritos das células da CNT nos mostra que dois genes do grupo SoxE – *Sox9* e *Sox10*, estão regulados positivamente sob tratamento com FGF8. O fator de transcrição *Sox10* tem uma expressão contínua na CNT migratória e isso deve-se em parte ao fato de que este gene é capaz de sofrer auto-regulação, em outras palavras, *Sox10* é capaz de promover sua própria expressão. No entanto, um estudo realizado em embriões de camundongo mostrou que essa auto-regulação é dependente da atividade conjunta de *Tfap2a* e *FoxD3* (WAHLBUHL et al., 2012). Observamos que o fator de transcrição *FoxD3* também se encontra regulado positivamente sob tratamento com FGF8 em nossas culturas, e além do seu papel em permitir a auto-regulação de *Sox10*, este gene atua ativando *Sox10* de forma direta (DUTTON et al., 2008; WAHLBUHL et al., 2012). O trabalho realizado por Dutton e colaboradores (2008) utilizou técnicas que combinam computação e genômica para identificar as regiões regulatórias de *Sox10* em embriões de peixe-zebra e, com isso, o grupo demonstrou que as regiões que regulam a expressão de *Sox10* possuem vários sítios de ligação para *FoxD3* e outros genes essenciais na especificação da CN, como os genes *Wnt* e outros *Sox* (DUTTON et al., 2008).

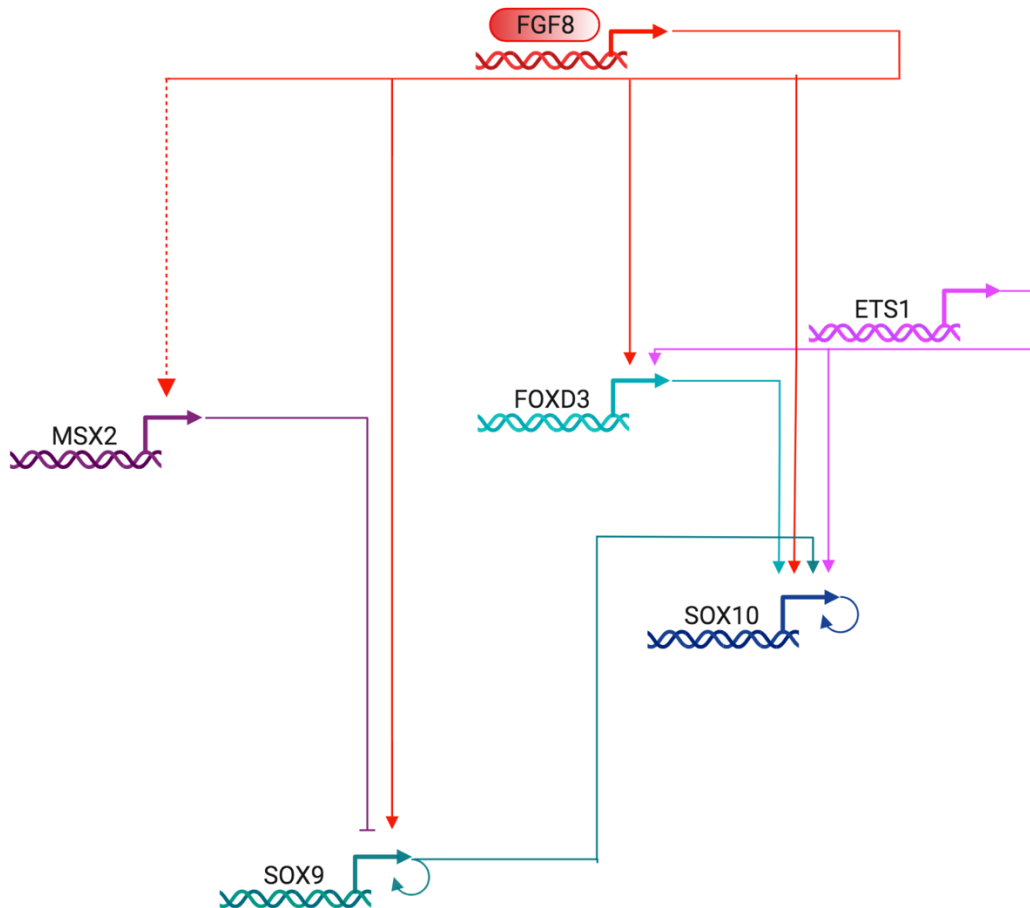
Através da análise transcriptômica, constatou-se ainda a regulação positiva de *Msx2* nas células da CNT tratadas com FGF8. A média dos fragmentos de RNAm para *Msx2* é de 50 nas células não tratadas com o morfógeno e 154 nas células tratadas, isto é, o tratamento com FGF8 parece estar promovendo o aumento da atividade deste gene. Uma vez que a análise dos transcritos foi submetida às células migratórias da CNT, a presença de *Msx2* soou no mínimo, curiosa. Isso porque existe um mecanismo já bem conhecido nas células da CNC envolvendo a



regulação transitória de *Sox9* e *Msx2* com a formação de derivados cartilagosos (TAKAHASHI et al., 2001). Como *Sox9* é um ativador da condrogênese, *Msx2* age reprimindo sua expressão para controlar temporalmente a diferenciação condrogênica, de forma que apenas quando as células da CNC atingem o processo mandibular onde irão sofrer a diferenciação em cartilagem de Meckel da mandíbula, a expressão de *Sox9* é reestabelecida. Esse mecanismo foi demonstrado no estudo feito por Takahashi e colaboradores (2001), onde a região do quarto ao sexto par de somitos de embriões de camundongo no dia embrionário 8 foi excisada e a região neuroepitelial, de onde emigram as células da CNC, foi mantida em cultivo durante 7 dias. No segundo dia de cultivo, foram realizadas infecções virais com o objetivo de inibir a expressão de *Msx2* nas células migratórias da CNC. As culturas celulares foram analisadas após 5, 7 ou 9 dias da transfecção viral. Com a inativação de *Msx2* durante a fase migratória das células, a condrogênese sofreu uma extensão, indicada pelo aumento da expressão de marcadores cartilagosos como ColIII e Agrecan e ainda, pelo aumento da área corada com Azul de Alcian, um corante para nódulos cartilagosos (TAKAHASHI et al., 2001). Apesar do aumento da condrogênese observado nas culturas deficientes de expressão de *Msx2*, o papel inibitório deste gene no período migratório é muito importante, uma vez que existem relatos de anormalidades craniofaciais em embriões de camundongo com bloqueio direcionado da expressão de *Msx2* (SATOKATA et al., 2000). Em conjunto, estes trabalhos demonstram que *Msx2* regula negativamente *Sox9* nas células da CNC migratórias a fim de prevenir sua diferenciação prematura, mantendo-as em um estado migratório até que atinjam o local alvo de diferenciação, a saber, o primeiro arco branquial, onde irão encontrar determinados fatores de crescimento que serão permissivos à diferenciação craniofacial, inibindo a expressão de *Msx2* (TAKAHASHI et al., 2001). Estes trabalhos demonstram que o balanço entre os determinantes intrínsecos às células e o microambiente que estas encontram durante a migração e após atingir seu local-alvo, são extremamente importantes para o comprometimento de destino celular da linhagem condrogênica craniofacial. A análise de transcritos das células da CNT migratórias tratadas com FGF8 deste trabalho demonstrou um aumento robusto na expressão de *Msx2*, com um número médio de 154 *reads* levando em consideração 3 amostras. Em contrapartida, a expressão de *Sox9*, apesar de ter sido maior nas células tratadas com FGF8 – correspondendo 12 *reads* – foi relativamente baixa. Hipotetizamos que esse resultado se deu pelo fato de *Msx2* estar inibindo a expressão de *Sox9* durante o período migratório.

Finalmente, contrapondo os trabalhos que estudam a migração celular nas células da CNC e CNT, é possível perceber que alguns genes responsáveis pelo controle da migração nas células da CNC também exercem esse papel na CNT (Figura 25).

Figura 25 - Circuito de migração da CNT em células tratadas com FGF8.



Representação esquemática do circuito de migração da CNT. FGF8 regula diretamente *Sox10* que possui atividade auto-regulatória e também é regulado por outros três genes: *Ets1*, *Sox9* e *FoxD3*. Durante a fase migratória, *Msx2* inibe a expressão de *Sox9* para evitar a diferenciação mesenquimal precoce. A linha tracejada representa uma proposta de interação transcricional, não demonstrada previamente na literatura. Fonte: Própria autora.

#### 6.4 MÓDULO DE DIFERENCIAÇÃO CONDROCÍTICA DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL SOB TRATAMENTO COM FGF8

Todos os passos no desenvolvimento embrionário envolvendo as células da CN mencionados até o momento, desde sua especificação até a migração pelo corpo do embrião, antecedem um dos momentos mais importantes do período de existência de uma célula: Seu destino final, ou seja, sua diferenciação. Sob tratamento com FGF8, o circuito de expressão que leva à diferenciação condrocítica é ampliado nas células da CNT, de forma que a expressão de alguns genes-chave para a condrogênese é regulada positivamente sob tratamento com o morfógeno.

É impossível falar sobre a condrogênese a partir da CN sem começar evocando o papel do fator de transcrição *Sox9*, considerado um gene mestre para o desenvolvimento de cartilagem, uma vez que regula diretamente a expressão de uma gama de genes que dirigem a diferenciação condrocítica a partir das células da CNC (MORI-AKIYAMA et al., 2003). Existem principalmente duas linhas de evidência que sugerem a importância do gene *Sox9* para a condrogênese em embriões de mamíferos: primeiro, mutações do gene são conhecidas por causar displasias craniofaciais. Segundo, o RNAm de *Sox9* é expresso em condensações mesenquimais que posteriormente formam os nódulos cartilagosos. O trabalho clássico realizado por Mori-Akiyama e colaboradores (2003) utiliza a técnica *Cre-LoxP* para deletar a expressão de *Sox9* em embriões de camundongos e verificar os efeitos da ausência do gene na formação craniofacial. Muitos dos mutantes nulos para a expressão de *Sox9* morreram no período pós natal, devido a séria dificuldade respiratória decorrente da má formação do palato secundário, que apresentou uma grande fenda. Nos mutantes sobreviventes ao período pós natal, foi diagnosticado anormalidades faciais bruscas, como um crânio abobadado, focinho menor que o normal e mandíbula curta. Comparando a base do crânio entre embriões normais e mutantes, verificou-se que nos embriões mutantes a cartilagem e ossos endocondrais estavam ausentes, enquanto que os ossos intramembranosos foram conservados, esta diferença se dá essencialmente porque a formação dos ossos endocondrais – como o próprio nome sugere – tem início com a condensação de células mesenquimais e diferenciação condrogênica (BERENDSEN; OLSEN, 2015). Foi realizada uma análise a nível celular nos embriões mutantes e normais no dia embrionário 13.5, revelando que em condições normais, as células da CNC formam condensações mesenquimais condrogênicas, que se diferenciam em cartilagem de Meckel, cartilagem nasal e cartilagens da base do crânio. Nos embriões mutantes para *Sox9*, as condensações celulares não foram discerníveis e tanto a cartilagem de Meckel quanto a

cartilagem nasal e da base do crânio estavam completamente indetectáveis (MORI-AKIYAMA et al., 2003).

A análise da expressão de *Col2a1* – um marcador inicial de células condrogênicas – corrobora os resultados do grupo, estando este gene expresso na base do crânio, região nasal e na cartilagem de Meckel dos embriões normais e completamente abolido nestas mesmas regiões, no caso de embriões desprovidos da expressão de *Sox9*. Com estes resultados em mãos, o grupo se perguntou se a falta de elementos cartilagosos nos embriões mutantes poderia ser decorrente de uma falha na migração e sobrevivência das células da CNC. Assim, foi realizado um estudo da expressão de *Ap2*, um fator de transcrição chave para a sobrevivência das células migratórias da CNC (HOFFMAN et al., 2007). Tanto nos embriões mutantes quanto nos embriões normais, a expressão de *Ap2* foi detectada em estrias que se estendiam dos rombômeros aos arcos branquiais e à região frontonasal, indicando que a falha na formação dos elementos craniofaciais não estava relacionada com uma provável migração aberrante das células. A análise de TUNEL (utilizada para identificar e marcar cromatinas danificadas) não detectou nenhuma célula apoptótica no dia embrionário 13.5 de embriões normais. Já os embriões mutantes apresentaram algumas células em processo de apoptose neste mesmo dia embrionário. No entanto, os defeitos craniofaciais não são devidos a este fator, uma vez que a grande maioria das células da CNC sem a expressão de *Sox9* sobreviveram à fase migratória (MORI-AKIYAMA et al., 2003). Assim, fica claro que as anormalidades craniofaciais observadas foram todas decorrentes da ausência de expressão de *Sox9*, revelando o papel central e insubstituível que este gene exerce na formação craniofacial, ocupando uma posição também central na circuitaria de diferenciação condrocítica a partir das células da CNT sob tratamento com FGF8.

O aumento da expressão de *Sox9* nas células da CNT tratadas com FGF8 se deve ao fato de que esta família de fatores de crescimento possui a capacidade de regular a expressão de *Sox9* (MURAKAMI et al., 1999). Este efeito de FGFs sobre a expressão de *Sox9* é demonstrado com a cultura de condrócitos primários, obtidos a partir de ratos de 1 a 5 dias de vida (MURAKAMI et al., 1999). O tratamento com FGF2 nas culturas de condrócitos primários aumenta os níveis de RNAm de *Sox9* muito rapidamente, cerca de 30 minutos após ser adicionado ao meio de cultivo, sendo que após 90 minutos do tratamento com FGF2, os níveis da proteína Sox9 mostraram-se aumentados. Para analisar o mecanismo de regulação de *Sox9* exercido por FGF2, os níveis de expressão do promotor de *Col2a1* foram mensurados, uma vez

que a expressão do gene *Col2a1* é totalmente dependente de *Sox9*, que o regula diretamente (MURAKAMI et al., 1999). A ativação do promotor de *Col2a1* foi observada apenas em células tratadas com FGF2, indicando a necessidade deste fator de crescimento para regular positivamente a expressão de *Sox9* que por sua vez, é extremamente necessário para a expressão de *Col2a1* (MURAKAMI et al., 1999).

O mesmo trabalho examinou o papel das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) no circuito de sinalização que concerne à regulação positiva de *Sox9* sob tratamento com FGF, através de um inibidor da via de MAPK, conhecido como U0126. Muitas cascatas de sinalização de MAPK são essenciais para uma ampla variedade de processos celulares, como proliferação, apoptose e diferenciação (MURAKAMI et al., 1999). As quinases 1 e 2 (MAPK1 e MAPK2) são reguladas por quinases extracelulares (ERK) e desempenham um importante papel na diferenciação celular. Os sinais da via de MAPK são transmitidos através de cascatas de proteínas quinase ativadas sequencialmente, conhecidas como MAP4K, MAP3K e MAP2K. Existem numerosas vias de sinalização de MAPK, sendo que a mais estudada é a via ERK/MAPK, na qual a fosforilação das proteínas ERK são necessárias para a ativação das proteínas MAPK (GUO et al., 2020).

No trabalho realizado por Muramaki e colaboradores (1999), o aumento dos níveis da proteína *Sox9* nas culturas de condrócitos primários de camundongo deu-se paralelamente ao aumento da fosforilação de ERK1 e ERK2. Quando o inibidor U0126 foi adicionado ao meio de cultivo, observou-se um efeito antagônico, de forma que tanto os níveis de proteína *Sox9* como a fosforilação de ERK1 e ERK2 sofreram uma diminuição (MURAKAMI et al., 1999). Nosso estudo suporta a hipótese de que o aumento da expressão de *Sox9* causado por FGF é mediado pela via de sinalização ERK-MAPK. Comparando os resultados do trabalho supracitado com os resultados obtidos a partir do presente trabalho, observamos que de fato, o tratamento com FGF8 nas células da CNT aumenta os níveis de expressão de MAP2K3, de forma que nas células não tratadas tem-se um total de 7 *reads* do transcrito, enquanto que nas células tratadas com FGF8 este número passa para 61. Assim, hipotetizamos que este gene pode estar codificando a proteína responsável pela via de sinalização através da qual FGF8 regula o aumento de expressão de *Sox9*.

Muitos dos trabalhos que estudam a função e expressão de *Sox9* na condrogênese, investigam a atividade de *Col2a1* como uma forma de mensurar a própria expressão de *Sox9*, uma vez que estes dois genes estão extremamente imbricados no processo de formação

cartilaginosa (LI et al., 1995). O gene *Col2a1* é responsável por codificar a proteína colágeno do tipo II (ColII), que é formada estruturalmente por um homotrímero de cadeias  $\alpha$  1 idênticas. O principal componente da matriz extracelular de células cartilaginosas – compreendendo 60% do conteúdo proteico total – é o ColII, importante para manter a integridade das estruturas cartilaginosas (KOCHER; KULYK; GAY, 1986; SWALLA; UPHOLT; SOLURCH, 1988). Sendo assim, a transcrição de *Col2a1* em células mesenquimais precede a diferenciação condrocítica e como esperado, mutações neste gene foram associadas a condrodisplasias e conseqüentemente, formações esqueléticas anormais (LI et al., 1995). O trabalho realizado por Lefebvre e colaboradores (1997) dedicou-se a investigar o papel de *SOX9* neste contexto, demonstrando que este gene se liga e ativa o promotor de *COL2A1* humano, desencadeando a expressão do gene. Curiosamente, este resultado se repetiu tanto em células de linhagens condrogênicas quanto não condrogênicas, demonstrando que a presença de *SOX9* por si só é um fator importante para acarretar a expressão de *COL2A1* (RONIQUE LEFEBVRE et al., 1997). Molecularmente, os resultados do grupo podem ser vistos sob a ótica de um trabalho desenvolvido alguns anos antes, que demonstra que a sequência nucleotídica AATAAC (adenina–adenina–timina–adenina–adenina–citosina) é um local ideal de ligação para diversos genes Sox, incluindo *SOX9* e coincidentemente, cópias desta sequência estão presentes nas regiões regulatórias do gene *COL2A1* humano em abundância (METSARANDA et al., 1991).

Corroborando os resultados supracitados, destaca-se o trabalho realizado por Ling-Jim e colegas (1997), que evidencia a co-expressão de *Sox9* e *Col2a1* no desenvolvimento das cartilagens faciais. Esta co-expressão foi atestada através da técnica de hibridização *in situ* nos tecidos cartilagosos em desenvolvimento que foram seccionados, possibilitando a análise comparativa da distribuição de transcritos de *Sox9* e *Col2a1* em fetos de camundongos que se encontravam em estágios diferentes de desenvolvimento (NG et al., 1997). No estágio de 8,5 dias após o coito, *Sox9* foi expresso fortemente nas células migratórias da CNC e neste estágio, a expressão de *Col2a1* foi relativamente baixa. No entanto, em estágios mais posteriores do desenvolvimento, durante a formação dos derivados cartilagosos da face, este cenário foi alterado, de forma que *Sox9* e *Col2a1* encontraram-se igualmente expressos no mesênquima frontonasal e no mesênquima do arco branquial (NG et al., 1997). O papel de *Sox9* também se mostra necessário para a regulação de um segundo gene codificador de proteína de colágeno, *Colla2*, que codifica o colágeno do tipo I (ColI), estruturalmente composto por um homotrímero de cadeias  $\alpha$  2 idênticas. Assim como o ColII, o ColI é um importante componente

da matriz extracelular, encontrado na maioria dos tecidos conectivos e embrionários (COLE, 1994). Mutações nos genes que codificam o ColI estão principalmente relacionadas com uma condição hereditária conhecida como osteogênese imperfeita (OI), caracterizada em especial pela fragilidade óssea, de forma que os ossos podem sofrer repetidas fraturas sem causas aparentes (HALD et al., 2016).

Nossos dados apontam para uma hipótese outrora proposta por alguns autores: A existência de um osteocondroprogenitor derivado das células da CN (AKIYAMA et al., 2005; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, [s.d.]; MORI-AKIYAMA et al., 2003). O trabalho de Mori-Akiyama (2003) sugere que *Sox9* é o gene chave para a especificação dos osteocondroprogenitores, isto é, progenitores derivados da CN que são comuns tanto para osso quanto para cartilagem. Segundo este trabalho, a presença persistente de *Sox9* direciona as células para um destino condrocítico, regulando negativamente a expressão de marcadores fundamentais da linhagem osteocítica, como *Runx2* e *Osterix*. Em embriões de camundongos nulos experimentalmente para a expressão de *Sox9*, genes como *Runx2*, *Osterix* e *Colla1* passam a ser robustamente expressos. Em conjunto, estes resultados indicam que as células da CNC responsáveis pela formação dos elementos esqueléticos faciais são osteocondroprogenitoras. Dessa forma, quando impedidas de sofrer a diferenciação em cartilagem – devido à falta de expressão de *Sox9* – adquirem um destino celular caracterizado pela expressão de uma série de genes típicos de linhagem óssea (MORI-AKIYAMA et al., 2003). Mais tarde, Akiyama (2005) confirmou através de mapeamento genético da embriogênese de camundongos, que todas as células osteocondroprogenitoras necessitam da expressão de *Sox9* (AKIYAMA et al., 2005).

Em nossos dados de transcriptômica a partir da CNT, constatamos que o tratamento com FGF8 aumenta a expressão de *Colla2*, um marcador inicial de diferenciação osteogênica (AUGUSCIAK-DUMA et al., 2018). No entanto, não encontramos a expressão de nenhum marcador sequer que esteja relacionado com a diferenciação final de osteócitos. Além disso, a expressão de *Col2a1* – marcador de diferenciação condrocítica – sofreu um aumento de duas vezes na presença do tratamento com FGF8, enquanto que para *Colla2*, esse aumento foi de apenas uma vez. Reunidos, estes dados reforçam a existência de um osteocondroprogenitor, além de sugerir que FGF8 pode estar desempenhando um importante papel sobre os mesmos. Em parte, este papel pode estar relacionado com a regulação positiva de *Sox9* para a manutenção deste tipo de progenitor.

O subcircuito que compreende *Sox9* regulando genes responsáveis pela produção de ColII e ColIII, ambos componentes de matriz extracelular igualmente importantes para a formação de cartilagem, está regulado positivamente nas células da CNT sob tratamento com FGF8. Capturamos através da análise transcriptômica, o papel imprescindível que *Sox9* exerce na condrogênese, sua presença é indispensável para diferentes passos do desenvolvimento da CN, de forma que além de regular diretamente genes importantes para a formação cartilaginosa, *Sox9* também é capaz de regular positivamente a sua própria expressão, mantendo assim como *Sox10*, uma atividade auto-regulatória (MEAD et al., 2013).

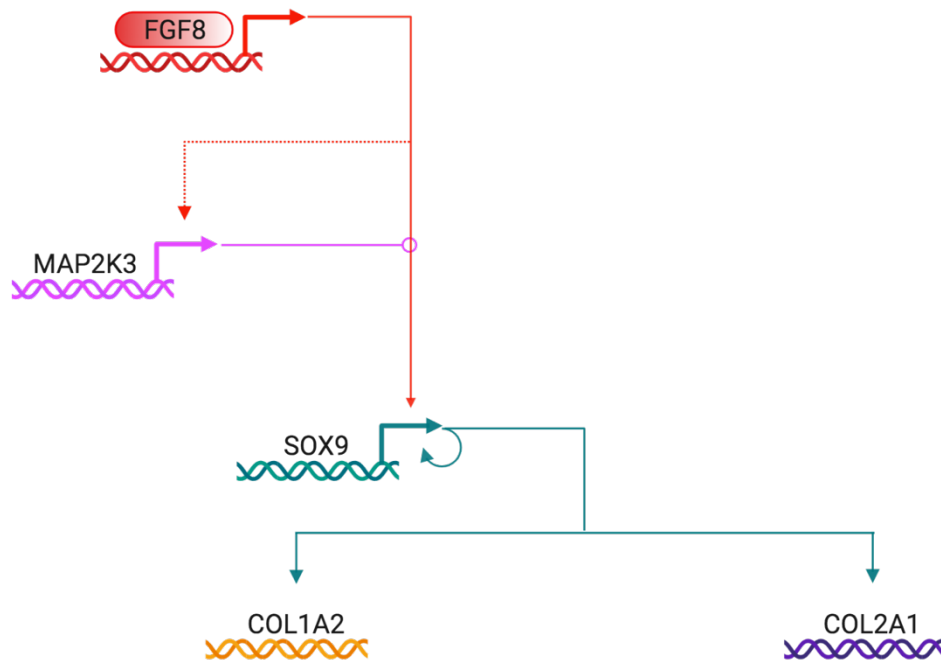
O trabalho realizado por Soldatov e colaboradores (2019) revela que durante o desenvolvimento embrionário, os progenitores da CN adotam vieses iniciais de diferenciação (SOLDATOV et al., 2019). Importante, isso não significa dizer que as células da CN são pré-programadas e emergem do TN com um destino já determinado. Ao contrário, há módulos de diferenciação “engatilhados”, representando uma heterogeneidade transcricional que pode ser modulada em função do microambiente que estas células encontram no seu caminho de migração. Em outras palavras, conforme as células migram pelo corpo do embrião em desenvolvimento, os circuitos relacionados com a diferenciação celular se afunilam progressivamente e por fim, são estabelecidos. Através de uma análise transcriptômica espaçotemporal, os autores demonstraram que um dos primeiros circuitos a serem observados no desenvolvimento das células da CN é responsável pela diferenciação mesenquimal, ocorrendo na fase de delaminação da CN (SOLDATOV et al., 2019). Em outras palavras, o circuito de expressão gênica que leva à diferenciação condrocítica pode ser estabelecido muito cedo nas células da CN.

Podemos hipotetizar que o tratamento com FGF8 no momento de migração das células da CNT, seguido de um substrato permissivo para a diferenciação cartilaginosa representado por Matrigel™, favorece a atividade de uma gama de genes centrais para a formação de cartilagem, que atuam em conjunto promovendo o aumento do número e da frequência de nódulos cartilagosos que podem ser observados em cultura celular (Figura 26).

Uma vez que a CNT corresponde à uma população heterogênea de células, resta saber se sob o tratamento com FGF8, o circuito de diferenciação condrogênica é expresso de forma mais robusta por determinadas células ou então, existem mais células que passam a expressar estes transcritos em resposta ao tratamento. Uma análise através da técnica de hibridização *in situ* poderia acessar e responder esta questão.



Figura 26 - Circuito de diferenciação condrocítica da CNT em células tratadas com FGF8.



Representação esquemática do circuito de diferenciação condrocítica a partir das células da CNT. FGF8 regula diretamente *Sox9* que possui atividade auto-regulatória. *Sox9* regula diretamente genes essenciais para a formação de cartilagem como *Col2a1* e *Col1a2*. A sinalização regulatória de FGF8 sobre *Sox9* é mediada pela via de sinalização ERK/MAPK. A linha tracejada representa uma proposta de interação transcricional, não demonstrada previamente na literatura Fonte: Própria autora.

## 6.5 GENES HOX

A expressão dos genes *Hox* mantém-se praticamente inalterada a despeito do tratamento com FGF8 (resultados não mostrados). Dos 15 genes *Hox* detectados a partir do transcriptoma, apenas 3 exibiram expressão diferencial nas células da CNT que receberam ou deixaram de receber o tratamento com FGF8, sendo eles *HoxC4*, *HoxC6* e *HoxD4*. Dentre os três genes *Hox* com expressão diferencial entre células tratadas ou não tratadas com FGF8, *HoxC6* foi o que capturou nossa atenção, uma vez que se mostrou regulado apenas nas células da CNT que não receberam o tratamento com FGF8, ou seja, a presença do morfógeno inibiu por completo a expressão deste gene. Na região cranial, FGF8 atua inibindo a expressão de *HoxA2*, sinalização inibitória importante para que as células possam se desenvolver em derivados mesenquimais.

Com isso, nos perguntamos se no tronco, *HoxC6* poderia estar agindo como *HoxA2* e de alguma forma, interferir na obtenção de nódulos cartilaginosos através das células da CNT, sendo necessária sua inativação para obtenção dos mesmos. Para responder à questão, nos lançamos à literatura pré-existente.

A transcrição de *HoxC6* pode ser desencadeada por dois promotores, gerando duas proteínas distintas que compartilham o mesmo sítio de ligação ao DNA, ou seja, o mesmo homeodomínio (CHARIOT; GIELEN, 1997). Ambos os produtos de *HoxC6* podem atuar como ativadores ou repressores da transcrição, dependendo do contexto celular, que é bem amplo no caso de *HoxC6*. Este gene é expresso tanto em tecidos embrionários quanto adultos, revelando seus diferentes papéis na regulação transcricional em tempos, espaços e tecidos distintos (CHARIOT; GIELEN, 1997). A injeção de um morfolino para *HoxC6* logo no início do desenvolvimento de *Xenopus*, no estágio de 2 a 4 células, mostrou que a perda de sua função corta o eixo embrionário em uma posição muito específica no embrião, a saber, no limite entre pescoço e tórax (ZHU; SPAINK; DURSTON, 2017). Dessa forma, embriões que tiveram a expressão de *HoxC6* inibidas são capazes de desenvolver normalmente os derivados da cabeça, no entanto, todo o eixo corporal abaixo do pescoço deixa de ser formado. Esse efeito tão violento é observado pois a perda de função de *HoxC6* afeta expressão de genes pertencentes a todos os 4 grupos parálogos dos genes *Hox*: *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* e *HoxD*. Com a expressão ectópica de *HoxA7* e *HoxB9* nos embriões mutantes, o fenótipo afetado pela perda de expressão de *HoxC6* foi recuperado, demonstrando que a expressão dos genes *Hox* é muito conservada e interligada nos vertebrados (ZHU; SPAINK; DURSTON, 2017). Além do seu bem conhecido papel na padronização do eixo corporal de embriões (E. PRINCE; L. PRICE; K. HO, 1998; ZIMMERMANN *et al.*, 1998), existem trabalhos que demonstram o importante papel de *HoxC6* no desenvolvimento e invasão de cânceres. A expressão de *HoxC6* e *HoxC4* é detectada em câncer de próstata, colocalizando com a expressão de outros genes previamente relacionados com o desenvolvimento deste tipo de câncer (LUO; FARNHAM, 2020). Até o presente momento, não encontramos na literatura trabalhos que demonstrem a ação de *HoxC6* com o desenvolvimento craniofacial de vertebrados.

A participação de *HoxC4*, *HoxD9* (expressos apenas nas células da CNT tratadas com FGF8) e *HoxC6* (expresso apenas nas células da CNT não tratadas com FGF8) no desenvolvimento da CN permanece elusiva e pouco abordada na literatura. Por isso, abordamos neste trabalho o papel dos genes *Hox* de uma forma mais global, pensando o que pode significar

no cenário deste trabalho, a majoritária inalteração da expressão dos genes *Hox* mediante o tratamento com FGF8.

Os genes *Hox* do grupo parálogo *B* foram os mais registrados a partir da análise transcriptômica das células da CNT, independentemente do tratamento com FGF8. Foram identificados 8 genes do grupo *HoxB*, sendo eles: *HoxB2 - 9*. Este resultado remete ao padrão de expressão dos genes *Hox* nos embriões, uma vez que os genes *Hox* do grupo *B* são expressos mais posteriormente no eixo corporal dos mesmos (PARKER; PUSHEL; KRUMLAUF, 2018). Além disso, a falta da expressão de *HoxB1* pode ser explicada pelo trabalho proposto por Pöpped e colaboradores (1995), que demonstrou através de ensaios em embriões de camundongo que a expressão de *HoxB1* é inibida nas células da CNC que migram a partir do rombômero 4 (r4) e volta a ser estabelecida após a migração (PÖPPED et al., 1995). Assim, uma vez que a análise transcriptômica das células da CNT foi realizada a partir de células migratórias, é possível supor que a CNT esteja se comportando de forma semelhante às células que migram a partir do r4, apresentando a expressão de *HoxB1* inibida durante a migração celular.

Trabalhos mencionados na introdução do presente trabalho, propõem que o fenótipo condrocítico apenas pode ser obtido a partir de culturas de longo prazo da CNT. A explicação para isso é que para que a diferenciação possa ocorrer, as células da CNT necessitam de um tempo hábil para que sua assinatura de genes *Hox* seja atenuada e conseqüentemente, sejam capazes de sofrer condrogênese (ABZHANOV *et al.*, 2003; MCGONNELL; GRAHAM, 2002). O trabalho de Ito e Ido (2006) evoca que a presença de *Hox9* era menor no terceiro dia de cultivo em células tratadas com FGFs. Entretanto, a partir do quinto dia, a porcentagem de células expressando este marcador era similar às células não tratadas. Assim, os autores propõem que inicialmente as células da CNT perdem a expressão dos genes *Hox* mas que posteriormente (cerca de 2 dias depois), esta é reestabelecida (IDO; ITO, 2006). Este resultado vai ao encontro do observado através das inferências transcricionais do presente trabalho, uma vez que a expressão de *HoxB9* é menor nas células tratadas com FGF8. A média de expressão do gene é 50,77 em células não tratadas e 31,99 em células tratadas. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram que a obtenção de cartilagem a partir da CNT pode ocorrer ainda nos primeiros dias de cultivo (CALLONI *et al.*, 2007; RAMOS-HRYB *et al.*, 2013; TAUFER; RODRIGUES-DA-SILVA; CALLONI, 2020). O presente trabalho, por sua vez, revela através de inferências transcricionais que de fato, as culturas de longo prazo não são uma

condicionante para que possam ser obtidos nódulos de cartilagem a partir das células da CNT, uma vez que os genes necessários para a diferenciação condrocítica – como *Sox9*, *Colla2* e *Col2a1* – já estão presentes desde a fase migratória das células.

O fato de não terem sido encontradas alterações significativas nos níveis de expressão dos genes *Hox* pode ser visto por três diferentes ópticas: Primeiro, até o quinto dia (dia aproximado em que começaram a ser observados nódulos cartilagosos nos trabalhos anteriores do grupo) pode haver uma mudança na expressão dos genes *Hox* e estes passam a ser regulados negativamente, hipótese passível de comprovação através de uma análise transcriptômica temporal, acompanhando os níveis de expressão dos genes *Hox* em diferentes momentos do cultivo celular. Segundo, o tratamento com FGF8 é suficiente em estimular a condrogênese a despeito da presença dos genes *Hox* ou ainda, os genes *Hox* com a expressão alterada em função do tratamento com FGF8 ou da ausência deste, não atuam de forma a impossibilitar a condrogênese a partir da CNT, o que faz bastante sentido, uma vez que não são genes relacionados com a perda dos derivados esqueléticos.

## 6.6 FGF8 DESPERTA O POTENCIAL ANCESTRAL DA CRISTA NEURAL NAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRONCAL

Nossos resultados apontam que o circuito de diferenciação condrocítica encontra-se estabelecido nas células da CNT muito cedo, desde o período de migração e independente do tratamento com FGF8, corroborando os resultados mais recentes nesta área de estudo (SOLDATOV et al., 2019). Fica claro que FGF8 atua amplificando o circuito de diferenciação condrocítica, de forma que diversos fatores de transcrição relacionados com a condrogênese aparecem com um número de expressão maior nas células que foram tratadas com FGF8 no período migratório, em comparação com as células que não receberam este tratamento. Dessa forma, hipotetizamos duas situações distintas que podem estar ocorrendo em nossas culturas sob tratamento com FGF8: Primeiro, o tratamento com FGF8 estaria agindo de forma a tornar a CNT mais semelhante, em termos de expressão gênica, à CNC, regulando positivamente a expressão de genes relacionados com a diferenciação ectomesenquimal, e, por isso, vemos em nossos resultados um aumento robusto tanto no número quanto na frequência de aparecimento de nódulos de cartilagem nesta condição. Segundo, o tratamento com FGF8 pode estar despertando um potencial latente de diferenciação mesenquimal nas células da CNT. Isto é, os

genes de diferenciação condrogênica não estão inibidos nessas células, ao contrário, estão presentes no programa gênico da CNT e o papel de FGF8 é despertá-los de um estado de dormência, seria o de permitir a sobrevivência de mais progenitores com essa circuitaria, uma vez que FGF8 possui um papel já bem documentado na sobrevivência de progenitores dotados de potencial ectomesenquimal (TRUMPP *et al.*, 1999).

A primeira hipótese, de que FGF8 estaria transformando as células da CNT em células da CNC é de fato intrigante, visto que FGF8 é um fator de crescimento que acompanha o desenvolvimento da CNC em diversos momentos, sendo um fator chave para o desenvolvimento do esqueleto craniofacial a partir destas células (CREUZET; COULY; LE DOUARIN, 2005).

Um trabalho chave que corrobora esta hipótese foi realizado em 2016 por pesquisadores expoentes da área que demonstraram que a expressão forçada de determinados genes de CNC na CNT é capaz de reprogramá-la, de forma que esta passa a adotar um caminho de diferenciação típico de células da CN derivadas da região cefálica (SIMOES-COSTA; BRONNER, 2016). A eletroporação com fatores de transcrição clássicos presentes no desenvolvimento da CNC (*Tfap2b*, *Sox8* e *Ets1*) resultou na reprogramação das células da CNT. Estas células não somente foram capazes de sofrer a diferenciação em derivados mesenquimais, como passaram a expressar marcadores condrocíticos, como *Runx2* e *Alx1*, enquanto marcadores de tronco, como *Dbx2* e *Hes6* sofreram uma regulação negativa robusta nas células reprogramadas (SIMOES-COSTA; BRONNER, 2016). Nossos dados demonstram que sob o tratamento com FGF8, dois dos três marcadores utilizados para a reprogramação celular são positivamente regulados, *Tfap2b* e *Ets1*. Dentre eles, *Ets1* é denotado na literatura como um gene exclusivo de CNC (BAREMBAUM; BRONNER, 2013; THÉVENEAU; DUBAND; ALTABEF, 2007) que encontra-se regulado positivamente sob tratamento com FGF8.

Ainda corroborando esta hipótese, temos *Lhx8*, um gene que curiosamente apresenta-se regulado positivamente exclusivamente nas células da CNT tratadas com FGF8. Apesar de não estar envolvido diretamente com a condrogênese, *Lhx8* corresponde a um dos elementos cruciais para o desenvolvimento e padronização da dentição em mamíferos (ZHOU *et al.*, 2021). Assim como *Ets1*, *Lhx8* é outro gene de assinatura cranial que está presente nas células da CNT sob tratamento com FGF8 durante o período migratório. A CNT não tem a capacidade de gerar dentes, sendo esta restrita à CNC, única fonte de mesênquima capaz de sustentar o desenvolvimento dentário e além disso, originar o periodonto, tecido que circunda os dentes,

mantendo-os posicionados corretamente (MILETICH; SHARPE, 2004). Como em todos os outros processos do desenvolvimento embrionário, a formação dos dentes requer a participação de inúmeros fatores, destes, tanto FGF8 quanto BMP2 são cruciais, sendo capazes de fazer uma regulação fina de interações importantes para o desenvolvimento dos dentes (MUSTONEN *et al.*, 2002).

Essa regulação fina e orquestrada é abordada no trabalho publicado recentemente por Zhou e colaboradores (2021), onde as células-tronco humanas da polpa do terceiro molar foram analisadas quanto à sua expressão gênica, demonstrando que *Fgf8* e *Bmp2* agem em conjunto para regular a expressão de *Lhx8* e permitir o desenvolvimento dos dentes. A expressão de *Fgf8* é detectada no epitélio dental a partir do dia embrionário (E) 9 (TUCKER; SHARPE, 2004), passando a regular a expressão de *Lhx8*, que é detectada entre E12.5 e E16.5 (ZHOU *et al.*, 2021).

Durante o desenvolvimento dos dentes, têm-se basicamente duas fases: a primeira é a fase de proliferação e a segunda, de diferenciação. Durante a fase de proliferação, *Lhx8* e *Suv39h1* (um modificador epigenético), inibem a odontogênese mantendo as células em um estado proliferativo e indiferenciado, através da metilação nos promotores de genes relacionados com a diferenciação. Cabe ressaltar que *Lhx8* ou *Suv39h1* atuam sempre em conjunto, de forma que com a ablação de qualquer um dos dois, genes de matriz extracelular começam a ser expressos enquanto marcadores de proliferação começam a ser inibidos, encaminhando a célula para a diferenciação (ZHOU *et al.*, 2021). Durante a expressão de *Lhx8*, *Fgf8* permanece sendo expresso e contribui para a proliferação das células do mesênquima dentário. No estágio de diferenciação, a expressão de *Fgf8* – e consequentemente de *Lhx8* – é reduzida drasticamente, dando espaço para a expressão do gene protagonista da diferenciação dental: *Bmp2*, que promove a odontogênese ao mesmo tempo em que coíbe a expressão de *Lhx8*. Para consolidar a observação *in vitro*, o grupo realizou experimentos *ex vivo*, utilizando folículos dentários dissecados de embriões de camundongos no estágio E12.5, com o uso de pinças e sob controle microscópico. Consistente com os experimentos de cultivo celular, o modelo de cultura de órgãos *ex vivo* revelou que *Fgf8* aumentou a expressão de *Lhx8* no mesênquima dentário enquanto que *Bmp2* a suprimiu. Assim, o grupo propõe que o tratamento-ouro para indução odontogênica é composto pela combinação do tratamento com FGF8 durante 5 dias, seguido do tratamento com BMP2 por mais 5 dias, aumentando de forma significativa

marcadores relacionados com o desenvolvimento dos dentes, como *Runx*, *Alp* e *Dspp* (ZHOU *et al.*, 2021).

Levando em consideração os trabalhos supracitados, é possível notar que existe embasamento teórico para supor que as células da CNT sob tratamento com FGF8 estejam adotando um comportamento mais parecido com as células da CNC. O tratamento com *Fgf8* não somente passa a aumentar a expressão de genes de assinatura cefálica (*Tfap2b*, *Ets1*), como é a condicionante para a expressão de um gene envolvido com a diferenciação de dentes (*Lhx8*), processo indiscutivelmente controlado pelas células da região cefálica (MILETICH; SHARPE, 2004). Refletindo sobre a presença de *Lhx8*, qual seria a razão de sua expressão unicamente nas células tratadas com FGF8, se não a de imprimir uma identidade cefálica às células da CNT? Deixemos essa dúvida pairando enquanto nos direcionamos para a segunda hipótese: O tratamento com FGF8 estaria despertando a potencialidade ancestral das células da CN, nas células da CNT.

Existem trabalhos na literatura que demonstram o potencial da CNT em originar componentes do exoesqueleto em animais primitivos, sugerindo que em algum momento da evolução, a CNT apresentava um potencial esqueletogênico e que este foi perdido com o passar dos milênios. Esta perda envolveu a origem do esqueleto interno de origem mesodérmica, substituindo o exoesqueleto e permitindo assim, uma maior mobilidade corporal aos animais (DONOGHUE; SANSOM, 2002; KAGUE *et al.*, 2012). Muitos dos peixes fósseis da classe dos agnatos e gnatostomados possuíam uma armadura espessa e rígida, o exoesqueleto. Esse exoesqueleto consistia em três camadas, sendo a mais superficial composta por odontódios com esmalte, dentina, osso de fixação e câmaras pulpares. O trabalho de Smith e Hall (1993) demonstrou que nos vertebrados primitivos existia um extenso exoesqueleto que se desenvolvia no tronco e na cauda de peixes extintos e alguns ainda existentes (SMITH; HALL, 1993). Curiosamente, a dentina é uma proteína indispensável para a formação dos dentes secretada pelos odontoblastos, que são células exclusivamente derivadas a partir da CNC (ZHANG *et al.*, 2020), o que pode indicar que em algum momento da evolução, as células da CNT possuíam a potencialidade de gerar odontoblastos que secretavam dentina, para a formação do exoesqueleto. Essa potencialidade esqueletogênica da CNT também pode ser observada em alguns animais modernos, como é o caso das raias. O estudo realizado por Gillis e colaboradores (2017) verificou que as células da CNT são capazes de sofrer a diferenciação em denticulos dermais mineralizados. Com uma lâmina, foi feito um pequeno corte na região superior do ovo

de raia da espécie *Leucoraja erinacea*, por onde foi injetado no lúmen do tubo neural CM-Dil, um marcador lipofílico que se incorpora à membrana plasmática das células da CN. Depois de 5 dias, as células marcadas começaram a adotar suas rotas migratórias, e cerca de 4-5 meses após a injeção (a gestação do animal costuma durar cerca de um ano), o exame histológico revelou que as células da CNT marcadas com CM-Dil diferenciaram-se em derivados troncais como melanócitos e gânglios da raiz dorsal e além disso, deram origem à camada de odontoblastos dos denticulos dérmicos do tronco (GILLIS; ALSEMA; CRISWELL, 2017). Esses resultados demonstram que ao longo da evolução, a CNT teve seu potencial esqueletogênico suprimido em tetrápodes, mas que este ainda pode ser observado em alguns animais modernos e pode ser recuperado através de cultivos *in vitro* em condições favoráveis.

Agora, temos em mãos as duas hipóteses de como FGF8 pode estar agindo nas células da CNT, estaria o tratamento transformando as células da CNT em CNC ou apenas despertando um potencial latente que a CNT já tem como herança evolutiva? Levando em consideração os nossos resultados e o conjunto de todos os trabalhos discutidos, a segunda hipótese nos parece ser a mais parcimoniosa. Independentemente do tratamento com FGF8, a 15 horas do período de migração, um módulo com os genes necessários para que as células possam dirigir-se para diferenciação condrocítica foi detectado através da análise dos transcritos da CNT. Eventualmente isso pode estar estabelecido até antes do tempo supracitado e uma análise transcriptômica temporal poderia acessar essa questão. Diferente do que foi proposto por Simões-Costa (2016), nosso trabalho sugere que as células da CNT já possuem a expressão dos genes necessários para originar derivados cartilagosos e o que FGF8 faz é amplificar este circuito de diferenciação condrocítica, promovendo a sobrevivência de progenitores específicos, para que a formação de cartilagem ocorra quando as células encontram um ambiente favorável para essa escolha de destino – que no caso deste trabalho, foi o substrato Matrigel<sup>TM</sup>. Em outras palavras, FGF8 pode estar mantendo “ativo” o circuito de diferenciação condrocítica por mais tempo, até que as células encontrem um ambiente favorável e assim, a diferenciação possa ocorrer.

Nossos experimentos *in vitro* reforçam o papel inicial de FGF8 na diferenciação condrocítica, revelando que o tratamento com o morfógeno durante o período migratório das células (cultura primária) aliado a um microambiente favorável durante a cultura secundária, são os grandes responsáveis pela formação dos nódulos cartilagosos observados nas culturas secundárias. Não há diferença significativa na obtenção de cartilagem entre as células que foram



tratadas com FGF8 unicamente no período de cultura primária e as células que foram tratadas durante todo tempo de cultivo (culturas primária e secundária), vide Figura 17 – página 59.

Em um trabalho do grupo realizado a partir das células da CN mesencefálica, observamos resultados semelhantes. Da Costa e colaboradores (2018) cultivaram as células da CNC sob tratamento com FGF8 durante as culturas primárias, enquanto que nas culturas secundárias as células foram submetidas à diferentes tratamentos, combinando FGF8 e Shh em diferentes janelas temporais. Nas células da CNC tratadas com FGF8 durante a cultura primária, foi detectada uma área maior de expressão de Sulfato de Condroitina – um importante marcador de cartilagem – ao final de 10 dias de cultivo, ou seja, todas as culturas que receberam FGF8 na fase de cultivo primário exibiram mais nódulos de cartilagem comparado às culturas que não receberam FGF8 neste primeiro momento (DA COSTA; TRENTIN; CALLONI, 2018).

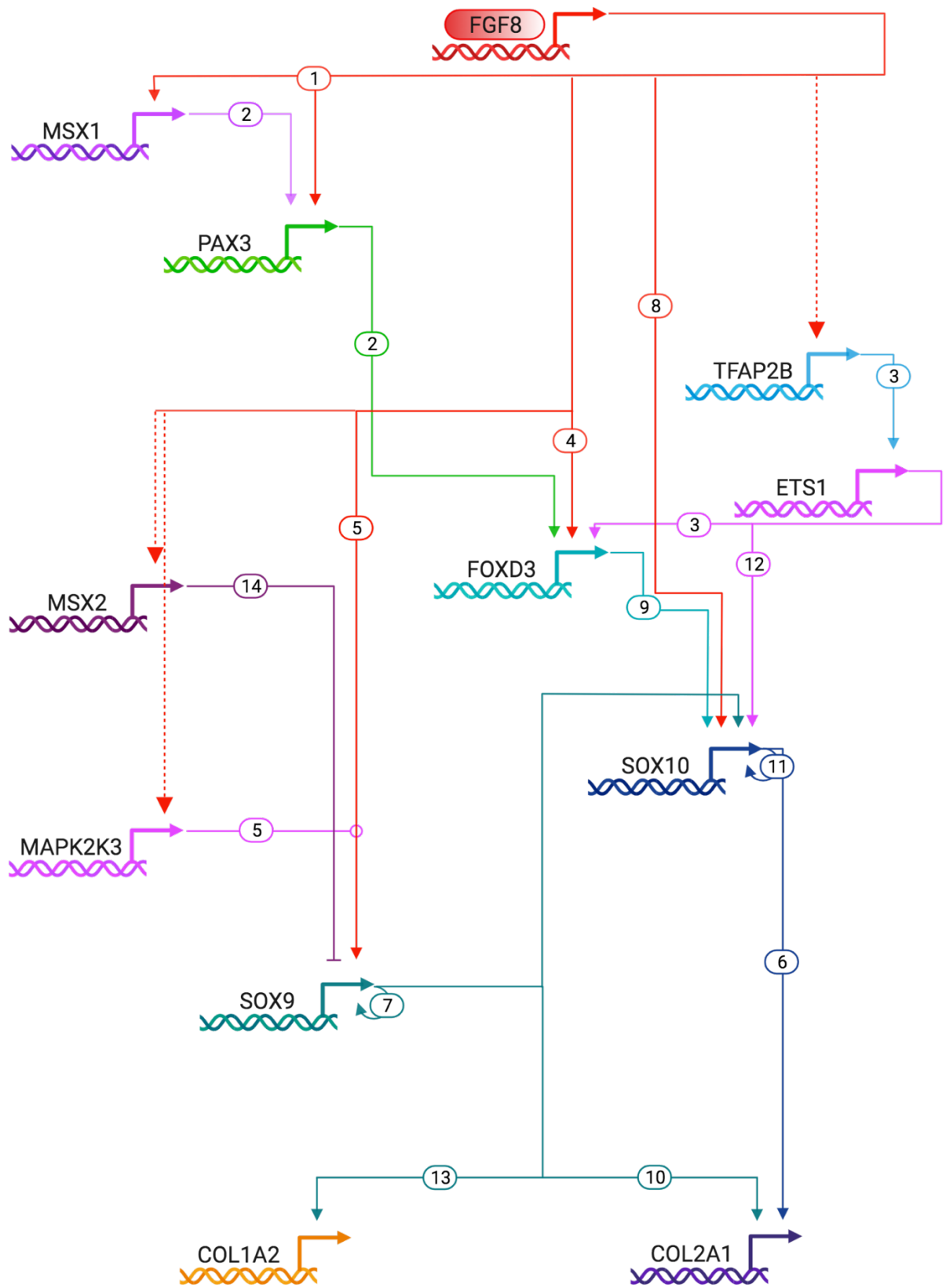
Observando os nossos dados de experimentação *in vitro* à luz dos dados de análise transcriptômica, propomos que as células da CNT claramente são muito responsivas ao FGF8, que age amplificando o módulo de diferenciação condrocítica já existente nestas células ainda no período migratório. Isso explica o porquê de o tratamento com FGF8 nas culturas primárias ser suficiente para a formação de cartilagem tanto nas células da CNT quanto nas células da CNC, visto ser no período de migração que acontecem os grandes *inputs* moleculares para que as células possam enveredar para um caminho de diferenciação condrogênica. Esses *inputs* moleculares são representados por uma série de decisões binárias progressivas tomadas pelas células da CN rumo à diferenciação. O viés de diferenciação mesenquimal é estabelecido em um momento muito inicial do desenvolvimento embrionário, na fase de delaminação das células da CN (SOLDATOV et al., 2019).

Quando pensamos em evolução, pensamos a nível de organismos e dificilmente nos damos conta de que a evolução também interfere nas células, nas proteínas, nos genes, nos receptores e conseqüentemente, no microambiente ao qual as células são expostas. Em outras palavras, o curso evolutivo mudou a história dos animais na Terra, agindo profundamente e mudando a história de suas células. Nosso trabalho reafirma que o microambiente com o qual as células da CN entram em contato pode escrever a história de uma célula multipotente, conferindo a ela uma identidade. Portanto, o microambiente é uma poderosa força motriz da evolução das espécies e o fato de a CNT ancestral ter sido capaz de originar elementos do exoesqueleto aponta que o microambiente era favorável para tal diferenciação, ou seja, existiam fatores no caminho de migração dessas células que eram permissivos para seu destino

esqueletogênico. É possível ser FGF8 um destes fatores? É uma pergunta capciosa, mas que faz muito sentido. Podemos imaginar em um passado longínquo, que em algum momento, a expressão de FGF8 no ectoderma poderia acompanhar todo o eixo rostro-caudal do embrião, de forma que independentemente do nível axial do qual as células da CN emigrassem, entrariam em contato com o morfógeno, disparando circuitos de diferenciação ectomesenquimal e inibindo a expressão de *HoxA2*. Com o passar dos anos, a região da ectoderme que secreta FGF8 foi reduzida e hoje, corresponde a uma pequena parcela localizada na fronteira entre o mesencéfalo e o rombencéfalo, o istmo, de forma que *in vivo*, apenas as células da região cefálica entram em contato com esse fator, tão indispensável para a diferenciação ectomesenquimal.

Para finalizar essa Discussão, tanto os dados obtidos a partir de análise transcriptômica quanto os experimentos de cultivo celular, foram analisados em conjunto e passaram pelo crivo da literatura. Como resultado, surgiu o suprasumo deste trabalho: a primeira rede gênica que pode estar regulando a condrogênese na CNT sob o tratamento com FGF8, representada em uma forma clássica de cascata de regulação gênica. É importante salientar que dependendo do referencial teórico empregado, os fatores de transcrição que foram apresentados neste trabalho podem ser classificados de formas diferentes quanto ao momento de sua contribuição no desenvolvimento da CN. Portanto, os referenciais teóricos adotados para posicionar os genes dentro da rede regulatória de sinalização foram explicitados no texto e na Figura 27 / Tabela 3.

Figura 27 - Rede gênica regulatória que controla a diferenciação condrocítica em células da Crista Neural Troncal tratadas com FGF8.



Representação da cascata de sinalização necessária para a diferenciação condrocítica a partir de células da CNT sob tratamento com FGF8. Os módulos de sinalização encontram-se representados em três momentos principais do desenvolvimento da CNT, começando pelos genes de borda de placa neural e especificação da CN, sua migração ao longo do corpo do embrião até que sejam atingidos os locais alvo de desenvolvimento para que ocorra a diferenciação condrocítica. As setas de diferentes cores representam relações de regulação (ativação ou inibição) entre os genes e as setas pontilhadas representa relações transcricionais ainda não reportadas na literatura pré-existente e propostas pelo grupo como hipóteses. Os números presentes em cada uma das setas representam a literatura utilizada para estabelecer tal correlação (Tabela 3).

Tabela 3 - Bibliografia utilizada na construção das relações na rede gênica regulatória.

1	PLA P.; MONSORO-BURQ A.H. The neural border: Induction, specification and maturation of the territory that generates neural crest cells. <i>Dev Biol</i> , 2018.
2	SIMÕES-COSTA M.S.; MCKEOWN S.J.; TAN-CABUGAO J.; SAUKA-SPENGLER T.; BRONNER M.E. Dynamic and differential regulation of stem cell factor FoxD3 in the neural crest is Encrypted in the genome. <i>PLoS Genet</i> , 2012.
3	ROTHSTEIN M.; BHATTACHARYA D.; SIMOES-COSTA M. The molecular basis of neural crest axial identity. <i>Dev Biol</i> , 2018.
4	MONSORO-BURQ A.H.; FLETCHER R.B.; HARLAND R.M. Neural crest induction by paraxial mesoderm in <i>Xenopus</i> embryos requires FGF signals. <i>Development</i> , 2003.
5	MURAKAMI S.; KAN M.; MCKEEHAN W.L.; DE CROMBRUGGHE B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 2000.
6	SUZUKI T.; SAKAI D.; OSUMI N.; WADA H.; WAKAMATSU Y. Sox genes regulate type 2 collagen expression in avian neural crest cells. <i>Dev Growth Differ</i> , 2006.
7	MEAD T.J.; WANG Q.; BHATTARAM P.; DY P.; AFELIK S.; JENSEN J.; LEFEBVRE V.; A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration. <i>Nucleic Acids Res</i> , 2013.
8	HONORÉ S.M.; AYBAR M.J.; MAYOR R. Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in <i>Xenopus</i> embryos. <i>Dev Biol</i> , 2003.
9	CHEUNG M.; CHABOISSIER M.C.; MYNETT A.; HIRST E.; SCHEDL A.; BRISCOE J. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. <i>Dev Cell</i> , 2005.

10	NG L.J.; WHEATLEY S.; MUSCAT G.E.; CONWAY-CAMPBELL J.; BOWLES J.; WRIGHT E.; BELL D.M.; TAM P.P.; CHEAH K.S.; KOOPMAN P. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. <i>Dev Biol</i> , 1997.
11	SIMÕES-COSTA M.; BRONNER M.E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. <i>Development</i> , 2015.
12	BETANCUR P.; BRONNER-FRASER M.; SAUKA-SPENGLER T. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 2010.
13	BAI J.; ZHANG Y.; ZHENG X.; HUANG M.; CHENG W.; SHAN H.; GAO X.; ZHANG M.; SHENG L.; DAI J.; DENG Y.; ZHANG H.; ZHOU X. LncRNA MM2P-induced, exosome-mediated transfer of Sox9 from monocyte-derived cells modulates primary chondrocytes. <i>Cell Death Dis</i> , 2020.
14	TAKAHASHI K.; NUCKOLLS G.H.; TAKAHASHI I.; NONAKA K.; NAGATA M.; IKURA T.; SLAVKIN H.C.; SHUM L. Msx2 is a repressor of chondrogenic differentiation in migratory cranial neural crest cells. <i>Dev Dyn</i> , 2001.

## 7 CONCLUSÃO

- O tratamento com FGF8 promove um aumento no número e na frequência de nódulos cartilagosos observados a partir das células da CNT;
- Os genes de diferenciação condrocítica encontram-se em atividade nas células da CNT, conferindo a estas células a potencialidade latente de originar derivados mesenquimais, se corretamente estimuladas;
- O efeito de FGF8 pode estar ampliando o circuito de diferenciação condrocítica nas células da CNT. Este circuito é ativado durante a fase migratória e permanece até o período de cultura secundária, quando as células são cultivadas sobre Matrigel™ e expressam sua potencialidade condrocítica em resposta a um ambiente permissivo para tal;
- O potencial mesenquimal das células da CNT é documentado em vertebrados primitivos, bem como em alguns animais modernos, através da formação de exoesqueleto e dentículos dérmicos. Assim, FGF8 pode estar rememorando um passado evolutivo distante da CN ancestral, nas células da CNT.

## REFERÊNCIAS

ABZHANOV, A. et al. Dissimilar regulation of cell differentiation in mesencephalic (cranial) and sacral (trunk) neural crest cells in vitro. *Development*, v. 130, n. 19, p. 4567–4579, 2003.

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

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems: *Seminars in Cancer Biology*, Academic Press, 2005.

BRITSCH, S. et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes and Development*, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2001.

CALLONI G.W.; GLAVIEUX-PARDANAUD C.; LE DOUARIN N.M.; DUPIN E. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, n.50, 2007.

CHAZAUD C.; OULAD-ABDELGHANI M.; BOUILLET P.; DÉCIMO D.; CHAMBON P.; DOLLÉ P. AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, v. 54, n. 1, 1996.

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, 2013.

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, 2009.

CREUZET S.; COULY G.; LE DOUARIN N.M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat*, v. 207, n. 5, 2005.

DE CROZÉ, N.; MACZKOWIAK, F.; MONSORO-BURQ, A. H. Reiterative AP2a activity controls sequential steps in the neural crest gene regulatory network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 1, p. 155–160, 2011.

DONOGHUE, P. C. J.; SANSOM, I. J. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microscopy Research and Technique*, v. 59, n. 5, p. 352–372, 2002.

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. 238-249, 2010.

E. PRINCE, V.; L. PRICE, A.; K. HO, R. Hox gene expression reveals regionalization along the anteroposterior axis of the zebrafish notochord. *Development Genes Evolution*, 1998.

GANS, C.; NORTH CUTT, G. Neural Crest and the Origin of Vertebrates- A New Head. *Science*, p. 268–273, 1983.

GARNETT, A. T.; SQUARE, T. A.; MEDEIROS, D. M. BMP, wnt and FGF signals are integrated through evolutionarily conserved enhancers to achieve robust expression of Pax3 and Zic genes at the zebrafish neural plate border. *Development (Cambridge)*, v. 139, n. 22, p. 4220–4231, 2012.

GILLIS, J. A.; ALSEMA, E. C.; CRISWELL, K. E. Trunk neural crest origin of dermal denticles in a cartilaginous fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 50, p. 13200–13205, 2017.

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

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

HILGER-EVERSHEIM K.; MOSER M.; SCHORLE H.; BUETTNER R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene*, v. 260, n. 1-2, p. 1-12, 2000.

IDO, A.; ITO, K. Expression of chondrogenic potential of mouse trunk neural crest cells by FGF2 treatment. *Developmental Dynamics*, v. 235, n. 2, p. 361–367, 2006.

ITO, K.; MORITA, T.; SIEBER-BLUM, M. In Vitro Clonal Analysis of Mouse Neural Crest Development. *Developmental Biology*, p. 517–525, 1993.



KAGUE, E. et al. Skeletogenic Fate of Zebrafish Cranial and Trunk Neural Crest. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.

KELSH, R. N. Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*, v. 28, n. 8, p. 788-798, 2006.

KHUDYAKOV, J.; BRONNER-FRASER, M. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Developmental Dynamics*, v. 238, n. 3, p. 716–723, 2009.

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

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* V. 15, n. 5, p. 378-386, 2005.

KNIGHT, R. D. et al. AP2-dependent signals from the ectoderm regulate craniofacial development in the zebrafish embryo. *Development*, v. 132, n. 13, p. 3127–3138, 2005.

KRISHNAKUMAR, R. et al. FOXD3 Regulates Pluripotent Stem Cell Potential by Simultaneously Initiating and Repressing Enhancer Activity. *Cell Stem Cell*, v. 18, n. 1, p. 104–117, 2016.

LABONNE, C.; BRONNER-FRASER, M. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol*, v. 36, n. 2, p. 175-189, 1998.

LE DOUARIN, N. M. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: A long and still ongoing story. *Mechanisms of Development*, v. 121, n. 9, p. 1089-1102, 2004.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. The “beginnings” of the neural crest. *Developmental Biology Elsevier*, 2018.

LISTER, J. A. et al. Zebrafish Foxd3 is required for development of a subset of neural crest derivatives. *Developmental Biology*, v. 290, n. 1, p. 92–104, 2006.

LUO, T. et al. Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2. *National Institutes of Health*, v. 100, n. 2, p. 532-7, 2003.

LUO, Z.; FARNHAM, P. J. Genome-wide analysis of HOXC4 and HOXC6 regulated genes and binding sites in prostate cancer cells. *PLoS ONE*, v. 15, n. 2, 2020.

LWIGALE, P. Y.; CONRAD, G. W.; BRONNER-FRASER, M. Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis. *Development*, v. 131, n. 9, p. 1979–1991, 2004.

MAYOR, R.; THEVENEAU, E. The neural crest. *Development (Cambridge)*, v. 140, n. 11, p. 2247–2251, 2012.

MCGONNELL, I. M.; GRAHAM, A. Trunk Neural Crest Has Skeletogenic Potential. *Current Biology*, v. 12, n. 9, p. 767-71, 2002.

MILETICH, I.; SHARPE, P. T. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 72, n. 2, p. 200-12, 2004.

MINOUX, M.; RIJLI, F. M. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*, v. 137, n. 16, p. 2605-21, 2010.

MIZUSEKI K.; KISHI M.; MATSUI M.; NAKANISHI S.; SASAI Y. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development*, v. 125, n. 4, p. 579-87, 1998.

MONSORO-BURQ, A. H.; FLETCHER, R. B.; HARLAND, R. M. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development*, v. 130, n. 14, p. 3111–3124, 2003.

MONSORO-BURQ, A. H.; WANG, E.; HARLAND, R. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Developmental Cell*, v. 8, n. 2, p. 167–178, 2005.

MUNDELL, N. A.; LABOSKY, P. A. Neural crest stem cell multipotency requires Foxd3 to maintain neural potential and repress mesenchymal fates. *Development*, v. 138, n. 4, p. 641–652, 2011.

MUSTONEN, T. et al. Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. *Developmental Biology*, v. 248, n. 2, p. 281–293, 2002.

NICHANE, M. et al. Hairy2-Id3 interactions play an essential role in *Xenopus* neural crest progenitor specification. *Developmental Biology*, v. 322, n. 2, p. 355–367, 2008.

NIKITINA, N.; SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. Dissecting early regulatory relationships in the lamprey neural crest gene network. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, n. 51, p. 2083-8, 2008.

OPPENHEIMER, Jane M.; HAMBURGER, Viktor. The non-specificity of the germ-layers. *The Quarterly Review of Biology*, v. 51, p. 96-124, 1976.

PARKER, H. J.; PUSHEL, I.; KRUMLAUF, R. Coupling the roles of Hox genes to regulatory networks patterning cranial neural crest. *Developmental Biology Elsevier*, 2018.

PERERA, S. N.; KEROSUO, L. On the road again: Establishment and maintenance of stemness in the neural crest from embryo to adulthood. *Stem Cells*, v. 39, n. 1, p. 7-25, 2021.

POHL, B. S.; ÈCHEL, W. K. Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev*, v. 103, n. 1-2, p. 93-106, 2001.

RAMOS-HRYB, A. B. et al. Matrigel supports neural, melanocytic and chondrogenic differentiation of trunk neural crest cells. *International Journal of Developmental Biology*, v. 57, n. 11–12, p. 853–858, 2013.

ROTHSTEIN, M.; BHATTACHARYA, D.; SIMOES-COSTA, M. The molecular basis of neural crest axial identity. *Developmental Biology*, v. 444, 2018.

ROTHSTEIN, M.; SIMOES-COSTA, M. Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification. *Genome Research*, v. 30, n. 1, p. 35–48, 2020.

SATODA M.; ZHAO F.; DIAZ G.A.; BURN J.; GOODSHIP J.; DAVIDSON H.R.; PIERPONT M.E.; GELB B.D. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat Genet*, v. 25, n. 1, p. 42-46, 2000.

SIMÕES-COSTA, M. S. et al. Dynamic and Differential Regulation of Stem Cell Factor FoxD3 in the Neural Crest Is Encrypted in the Genome. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 12, 2012.

SIMÕES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, v. 142, n. 2, p. 242-57, 2015.

SIMOES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate. *Science*, v. 352, n. 6293, p. 1570–1573, 2016.

SMITH, M. M.; HALL, B. K. A Developmental Model for Evolution of the Vertebrate Exoskeleton and Teeth. 2003.

SOLDATOV R.; KAUCKA M.; KASTRITI M.E.; PETERSEN J.; CHONTOROTZEA T.; ENGLMAIER L.; AKKURATOVA N.; YANG Y.; HÄRING M.; DYACHUK V.; BOCK C.; FARLIK M.; PIACENTINO ML.; BOISMOREAU F.; HILSCHE M.M.; YOKOTA C.; QIAN X.; NILSSON M.; BRONNER M.E.; CROCI L.; HSIAO W.Y.; GUERTIN D.A.; BRUNET J.F.; CONSALEZ G.G.; ERNFORS P.; FRIED K.; KHARCHENKO P.V.; ADAMEYKO I. Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science*, v. 364, n. 6444, p. 9536, 2019.

STEMPLE D.L.; ANDERSON D.J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, v. 71, n. 6, p. 973-85, 1992.

SUZUKI, A.; UENO, N.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. *Xenopus msx1* mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4. *Development*, v. 124, n. 16, p. 3037-44, 1997.

TAUFER, C. R.; RODRIGUES-DA-SILVA, M. A.; CALLONI, G. W. Puramatrix allows differentiation of a broad repertoire of neural and mesenchymal phenotypes from trunk neural crest. *International Journal of Developmental Biology*, v. 64, n. 8–9, p. 433–443, 2020.

TRENTIN A.; GLAVIEUX-PARDANAUD C.; LE DOUARIN N.M.; DUPIN E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, n. 13, p. 4495-500, 2004.

TRÍBULO, C. et al. Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development*, v. 130, n. 26, p. 6441–6452, 2003.

TUCKER, A.; SHARPE, P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, n. 7, p. 499-508, 2004.

WEIDER, M.; WEGNER, M. *SoxE* factors: Transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* Academic Press, v. 63, p. 35-62, 2017.

WESTON, J. A.; THIERY, J. P. *Pentimento: Neural Crest and the origin of mesectoderm*. *Developmental Biology* Academic Press, v. 401, n. 1, p. 37-61, 2015.

ZHANG M.; ZHANG X.; LUO J.; YAN R.; NIIBE K.; EGUSA H.; ZHANG Z.; XIE M.; JIANG X. Investigate the Odontogenic Differentiation and Dentin–Pulp Tissue

Regeneration Potential of Neural Crest Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, 2020.

ZHOU, C. et al. FGF8 and BMP2 mediated dynamic regulation of dental mesenchyme proliferation and differentiation via Lhx8/Suv39h1 complex. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 25, n. 6, p. 3051–3062, 2021.

ZHU, K.; SPAINK, H. P.; DURSTON, A. J. Hoxc6 loss of function truncates the main body axis in *Xenopus*. *Cell Cycle*, v. 16, n. 11, p. 1136-38, 2017.

ZIMMERMAN B.; MOEGELIN A.; DE SOUZA P.; BIER J. Morphology of the development of the sagittal suture of mice. *Anat Embryol (Berl)*, v. 197, n. 2, p. 155-65, 1998.