

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento**

Bianca Luise Teixeira

**Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade  
e diferenciação das células da crista neural de aves**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andréa Gonçalves Trentin

Co-orientador: Dr. Giordano Wosgrau Calloni

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

T266e Teixeira, Bianca Luise

Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves [dissertação] / Bianca Luise Teixeira ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin. - Florianópolis, SC, 2011. 69 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia celular. 2. Crista neural. 3. Fator de Crescimento Epidérmico. 4. Melanócitos. I. Trentin, Andrea Gonçalves. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

CDU 576

Bianca Luise Teixeira

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) NA  
POTENCIALIDADE E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL  
DE AVES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de  
**MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO**  
na área de Células tronco e diferenciação celular, aprovada em sua  
forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento.

Orientadora

---

Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Banca Examinadora

---

Dra. Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)

---

Dra. Cláudia Beatriz N. M. de Aguiar (Membro)

---

Dr. Paulo Fernando Dias (Membro)

---

Dra. Cristine Maria Bressan (Membro)

---

Dr. Marcio Alvarez da Silva (Suplente)



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andréa Gonçalves Trentin, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu trabalho e por sempre me incentivar e me fazer ver o lado positivo de todas as situações.

Ao meu co-orientador Giordano Wosgrau Calloni, por todos os ensinamentos.

Ao querido Ricardo Garcez, que foi quem me ensinou os primeiros, e mais importantes, passos para seguir na Ciência. Que esteve sempre presente, mesmo longe, e que me mostrou que nem tudo é tão complicado quanto parece, basta termos boa vontade, dedicação e fé!

Aos meus queridos e verdadeiros amigos, que não precisam de um parágrafo individual aqui para saber quem são! Que mesmo perto ou longe, estão sempre ao meu lado, me apoiando, me divertindo, e muitas vezes aguentando o meu “bom humor”. Vocês são minha segunda família!

A todos os colegas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

À minha família, por todo amor, dedicação e apoio. Se não fosse por vocês eu não teria chegado até aqui. Agradeço muito à Deus por ter vocês na minha vida.

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



## RESUMO

TEIXEIRA, Bianca Luise. **Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves**. Florianópolis, 2011. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2011.

A crista neural (CN) é uma população de células originadas das margens dorsais do tubo neural durante o desenvolvimento de vertebrados. Essas células possuem um alto potencial migratório e dão origem a múltiplos fenótipos como neurônios, células gliais, melanócitos e a diversos derivados mesenquimais. Sabe-se que essa diversificação de fenótipos é espacialmente e temporalmente influenciada por fatores do microambiente. Vários fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), têm sido identificados como sendo capazes de direcionar a diferenciação de progenitores multipotentes da CN para tipos celulares específicos. Segundo Garcez e colaboradores (2009), o EGF é capaz de influenciar *in vitro* a diferenciação melanocítica das células da CN, aumentando o número de células pigmentadas em cultura. No presente trabalho investigamos os efeitos do EGF na potencialidade e diferenciação das células da CN de codornas (*Coturnix coturnix japonica*). Para isso culturas de massa e clonais de CN foram tratadas com EGF (10ng/mL). Nas células da CN truncal (CNT) os tratamentos foram realizados nas primeiras 20h, fase de migração das células a partir do tubo neural. Já para as células da CN cefálica (CNC) os tratamentos foram realizados após o período de migração, durante toda a cultura secundária. As células foram então fixadas e analisadas quanto à expressão do receptor de EGF (EGFR) e dos diferentes fenótipos celulares derivados da CN. Nossos resultados demonstram a expressão do EGFR pelas células da CNT 20h após o início da migração a partir do tubo neural, na cultura primária. O possível efeito do EGF na diferenciação condrocítica foi avaliado na CNC por apresentar o potencial mesectodermal. Em nossos resultados observamos frequência, número e tamanho dos nódulos de cartilagem equivalentes entre as condições controle e após tratamento com EGF, sugerindo que o EGF não influencia a diferenciação da CN para o fenótipo condrocítico. Para avaliar um possível efeito do EGF na potencialidade dos progenitores da CN, realizamos ensaios clonais, onde as células são plaqueadas individualmente sob controle microscópico. Identificamos progenitores comprometidos com as linhagens neuronal,

glial, melanocítica ou muscular lisa, assim como progenitores bi, tri e tetrapotentes para diversas combinações destes fenótipos celulares. As proporções dos progenitores assim como a eficiência clonal (cerca de 60%) foram equivalentes nas duas condições experimentais, demonstrando que o EGF não interfere na proliferação nem na potencialidade dos progenitores da CN. Em trabalho anterior verificamos que o EGF promove aumento do número de melanócitos diferenciados identificados pela presença de melanina. Investigamos, então, se EGF influencia na diferenciação final dos melanócitos, avaliando a relação entre a expressão do marcador da linhagem melanocítica (*melanocyte earlier marker*, MeLEM), que identifica tanto melanoblastos quanto melanócitos diferenciados, e a melanina. Observamos na condição controle que cerca de 20% das células da CN positivas para MeLEM também apresentavam melanina, enquanto que após o tratamento com EGF essa proporção foi de 60%, correspondendo a um aumento de 3X. Esses resultados indicam que o EGF deva estar atuando sobre a etapa final do processo de diferenciação dos melanócitos, possivelmente envolvendo o processo da síntese de melanina. Entender o papel do EGF sobre a diferenciação melanocítica certamente contribuirá para avanços nos estudos de patologias que envolvam alterações no padrão de pigmentação, e as suas consequências, em organismos vertebrados.

**Palavras-chave:** Crista neural, EGF, Melanócitos.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, Bianca Luise. **Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves.** Florianópolis, 2011. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2011.

The neural crest (NC) is a population of cells originated at the borders of the dorsal neural tube during development of vertebrates. These cells are highly migratory and give rise to multiple phenotypes such as neurons, glial cells, melanocytes and various mesenchymal derivatives. This multipotentiality is spatially and temporally influenced by the microenvironment. Several growth factors such as epidermal growth factor (EGF) have been identified as being able to direct the differentiation of NC multipotent progenitors to specific cell types. Garcez *et al.* (2009) have demonstrated that EGF influences the differentiation of NC to melanocytes, increasing the number of pigmented cells in culture. In the present study we have investigated the effects of EGF in cell differentiation potential of quail (*Coturnix coturnix japonica*) NC cells. Therefore, mass and clonal cultures of NC cells were treated with EGF (10ng/mL). In the trunk NC cells (TNC), treatments were performed within the first 20h of primary cultures, migration phase of NC cells from the neural tube. Nevertheless, the treatments of cephalic NC cells (CNC) were performed in the secondary culture, after the migration period. Cells were fixed, at the 6 day of secondary culture, and analyzed for the expression of EGF receptor (EGFR) and for the different cell phenotypes derived from NC. Our results demonstrate populations of TNC express the EGFR at 20h of primary culture. The possible effect of EGF on chondrocytes differentiation was assessed in CNC due to its mesectodermal potential. In our results, we have observed similar frequency, number and size of nodules of cartilage between control condition and after EGF treatment, suggesting that EGF does not influence the differentiation of NC to the chondrocyte phenotype. To evaluate a possible effect of EGF on the potentiality of NC progenitors, we performed clonal assays, where NC cells are individually plated under microscopic control. We have identified progenitors committed to the neuronal lineage, glial, melanocytic or smooth muscle, as well as bi, tri and tetrapotents progenitors for combinations of these cell phenotypes. The proportion of progenitors as well as the clonal efficiency (60%) was equivalent in the

two experimental conditions, demonstrating that EGF does not interfere in the proliferation and/or in the potential of NC progenitors. In previous work, we have found that EGF promoted increased number of differentiated melanocytes identified by the presence of melanin. We then investigated whether EGF influences the final differentiation of melanocytes, assessing the relative expression of the melanocyte lineage marker (MeEM), which identifies both melanoblasts and differentiated melanocytes; and melanin. We observed in the control condition that about 20% of NC cells are positive to MeEM and also to melanin. After EGF treatment, this proportion corresponds to 60%, representing an increase of three-fold. These results indicate that EGF should be acting on the final stage of melanocytes differentiation process, possibly involving the melanin synthesis. Understanding the role of EGF on melanocytic differentiation will certainly contribute to advances in studies of diseases involving changes in pigmentation pattern, and its consequences in vertebrate organisms.

Keywords: Neural Crest, EGF, Melanocytes

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Indução da CN durante o processo da neurulação.....	21
<b>Figura 2:</b> Mapa das rotas migratórias da Crista Neural Cefálica (CNC) e da Crista Neural Truncal (CNT).....	23
<b>Figura 3:</b> Modelo da segregação da linhagem celular na CN cefálica (A) e truncal (B).....	25
<b>Figura 4:</b> Diferenciação de melanócitos da crista neural.....	27
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo da Metodologia a ser utilizada para as culturas de células de CNC e CNT de embrião de aves.....	35
<b>Figura 6:</b> Análise da expressão proteica do receptor EGF na CNT após a migração das células a partir do tubo neural por imunofluorescência indireta.....	41
<b>Figura 7:</b> Gel de agarose 2% apresentando a expressão do gene para o receptor de EGF nas células controle e tratadas com EGF.....	42
<b>Figura 8:</b> Análise do fenótipo condrocítico sob influência de EGF nas células da CNC.....	43
<b>Figura 9:</b> Efeito do EGF sobre os nódulos de cartilagem derivados da CNC.....	44
<b>Figura 10:</b> Imagens ilustrativas de clones encontrados nos ensaios clonais.....	46
<b>Figura 11:</b> Imagens ilustrativas do fenótipo melanocítico através da marcação com anti-MeEM (A, C) e da expressão do pigmento melanina (B, D).....	50
<b>Figura 12:</b> Análise do efeito de EGF na proporção de células positivas para MeEM (A) e pigmentadas (B).....	51
<b>Figura 13:</b> Montagens a partir de fotografias de imunofluorescência para MeEM (A, C) e de campo claro para observação das células pigmentadas (B, D).....	52
<b>Figura 14:</b> Análise da densitometria obtida das células positivas para MeEM e das células com pigmento.....	53



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Anticorpos primários e secundários utilizados para reações de imunofluorescência.....	37
<b>Tabela 2:</b> Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAm por RT-PCR.....	39
<b>Tabela 3:</b> Análise fenotípica dos precursores da CNT sob o efeito de EGF.....	47
<b>Tabela 4:</b> Análise fenotípica dos precursores mono, bi, tri e tetrapotentes da CNT sob o efeito de EGF.....	48
<b>Tabela 5:</b> Análise da potencialidade dos progenitores da CNT.....	48
<b>Tabela 6:</b> Análise do tamanho dos clones sob o efeito de EGF.....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
$\alpha$ -MSH	Hormônio Alfa Estimulador de Melanócito
ANOVA	Análise de Variância
Ap2	Proteína adaptadora 2
BMP	Proteína Morfogenética de Osso
$\beta$ tubIII	Tubulina $\beta$ -III
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Crista Neural
CNC	Crista Neural Cefálica
CNT	Crista Neural Truncal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CS	Sulfato de condroitina
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato de Embrião
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ET3	Endotelina tipo 3
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HNK1	Natural Killer Humano 1
Ig	Imunoglobulina

KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de Potássio
MEC	Matriz Extracelular
MeIEM	Marcador precoce de melanócitos/melanoblastos
Mitf	Fator de transcrição associado à microftalmia
NaCl	Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hidrogenofosfato dissódico
NGF	Fator de crescimento de nervo
NRG1	Neuregulina tipo 1
PBS	Tampão Fosfato Salina
PBS Triton	PBS contendo 0,25% de Triton X100
PBS Tween	PBS contendo 0,05% de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PF	Paraformaldeído
RT	Transcriptase reversa
SBF	Soro Bovino Fetal
SCF	Fator de Crescimento de Célula Germinativa
Shh	Sonic hedgehog
SMA	Actina de Músculo Liso
SNC	Sistema Nervoso Central
T3	3-3'-5 triiodo-L-thironina
TGFβ	Fator de Crescimento Transformante Beta
Trp1	Proteína Relacionada à Tirosinase-1
Trp2	Dopacromo Tautomerase
TxRed	Vermelho do Texas
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{\circ}$	Grau
%	Por cento
$\chi^2$	Ki quadrado
g	Gramma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
ng	Nanograma
U	Unidades
<	Procedência menor



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. A CRISTA NEURAL.....	21
1.2. POTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CN.....	24
1.3. MELANÓCITOS DERIVADOS DA CN.....	26
1.4. FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF).....	28
1.5. JUSTIFICATIVA.....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. ANIMAIS.....	33
3.2. CULTURA DE CÉLULAS DA CN DE CODORNAS.....	33
<b>3.2.1. Cultura de células da CNC de codornas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2. Cultura de células da CNT de codornas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3. Cultura secundária e clonagens celulares.....</b>	<b>34</b>
3.3. TRATAMENTO DAS CULTURAS CELULARES COM EGF.....	35
3.4. ANÁLISE FENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	36
3.5. QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA.....	38
3.6. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE EGF (EGFR).....	38
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. CÉLULAS DA CN DE CODORNA EXPRESSAM RECEPTOR DE EGF.....	41
4.2. EFEITO DO EGF SOBRE DERIVADOS MESENQUIMAIS DA CN.....	42
4.3. AÇÃO DO EGF SOBRE A MULTIPOTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CNT.....	45
4.4. EFEITOS DO EGF SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DOS MELANÓCITOS DERIVADOS DA CNT.....	49
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A CRISTA NEURAL

A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória formada por uma população de células altamente multipotentes, e que foi identificada inicialmente em 1868 pelo embriologista suíço Wilhelm His como um grupo de células localizadas entre o tubo neural e a epiderme dos embriões dos vertebrados (Le Douarin e Kalcheim, 1999).

Durante o estágio de neurulação, a CN surge das bordas dorsais do tubo neural em fechamento. Nesse processo, em que as pregas da placa neural se dobram uma em direção a outra formando o tubo neural, há uma interação entre o ectoderma não neural e a região dorsal do futuro tubo neural. A interação entre esses dois tecidos é necessária para a indução da CN ao longo da linha média dorsal (Graham, 2003, Le Douarin e Kalcheim, 1999) (Figura 1).

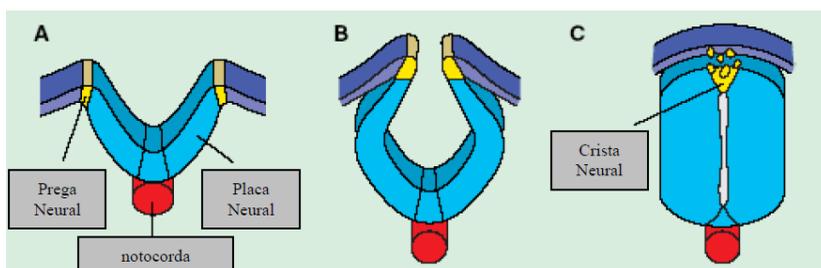


Figura 1: Indução da CN durante o processo da neurulação. Durante a neurulação, a placa neural (azul claro) dobra-se progressivamente para formar o tubo neural (A-C). As pregas neurais (amarelo) formam-se na interface entre a placa neural (azul claro) e o ectoderma não neural (azul escuro) sendo que e a interação entre estes dois tecidos é necessária para a indução da CN. As pregas neurais unem-se progressivamente de maneira a formar o aspecto mais dorsal do tubo neural e a CN (Adaptado de Graham, 2003).

A especificação da CN no neuroectoderma é iniciada em resposta à ação combinada de diversos morfógenos, incluindo as proteínas morfogenéticas de osso (BMPs), os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e membros da família Wingless (Wnt), os quais induzem a expressão de fatores de transcrição específicos da CN, como Snail1/2, Sox9, Sox10, Pax3, Ap2, Msx1, Zic1 e Foxd3 (Harris e Erickson, 2007). Esses fatores de transcrição estão envolvidos na delaminação das células da CN a partir do tubo neural, processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal. Nesse processo as

células desprendem-se do neuroepitélio de origem, assumindo um caráter altamente migratório. Para que ocorra essa transição e posterior migração das células da CN são necessárias alterações significativas nos padrões de citoarquitetura e adesão celular como, por exemplo, uma modificação na expressão de moléculas como as caderinas. Essas correspondem a uma grande família de moléculas de adesão celular que desempenham papéis críticos em eventos morfogenéticos durante o desenvolvimento embrionário, incluindo separação, motilidade e sinalização celulares (Taneyhill, 2008).

No embrião de aves a migração das células da CN ocorre após o fechamento do tubo neural, primeiramente na região anterior e progressivamente estende-se para a região caudal. Já no embrião de camundongos, a migração da CN inicia logo após a fusão das metades bilaterais da placa neural na região caudal do mesencéfalo e rostral do rombencéfalo (Trainor, 2005). Essas células migram por rotas específicas no embrião, originando uma grande diversidade de tipos celulares em diversos órgãos e estruturas do corpo (Le Douarin e Kalcheim, 1999; Dupin *et al.*, 2010).

Ao longo do eixo ântero-posterior, a CN pode ser dividida em dois grandes domínios funcionais: CN cefálica (CNC) e CN truncal (CNT). A CNC origina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, derivados neurais (neurônios e células gliais) do sistema nervoso periférico, além de melanócitos, células musculares lisas, adipócitos e a quase todo tecido conjuntivo e esquelético da cabeça e do pescoço (Le Douarin e Kalcheim, 1999, Le Douarin *et al.*, 2008). Os derivados mesenquimais da CNC são também chamados de ectomesênquima ou mesectoderma, para esclarecer sua origem ectodérmica a partir da CN, e diferenciá-los do mesênquima de origem mesodérmica (Dupin *et al.*, 2010). Já as células da CNT, *in vivo*, dão origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, assim como melanócitos da pele, porém, apenas *in vitro* possuem a capacidade de originar derivados mesenquimais (Graham, 2003; Calloni *et al.*, 2007).

As células da CN são guiadas por rotas temporalmente e espacialmente definidas por diversos sinais de orientação ambientais no embrião. Cada caminho é moldado pela expressão de uma composição distinta de proteínas que tanto atraem quanto repelem a migração dessas células (Gammill e Roffers-Agarwal, 2010). As rotas migratórias adotadas pelas células da CN diferem dependendo da região em que essas células emergem do tubo neural. Na região cefálica, uma população de células migra para região frontal e também lateralmente através dos arcos faríngeos a fim de originar estruturas maxilares e

mandibulares (Couly *et al.*, 1996; Kontges e Lumsden, 1996). Já outra população, proveniente dos últimos rombômeros, migra dorso-ventralmente em direção ao tubo digestivo anterior para gerar o sistema nervoso entérico (Figura 2A).

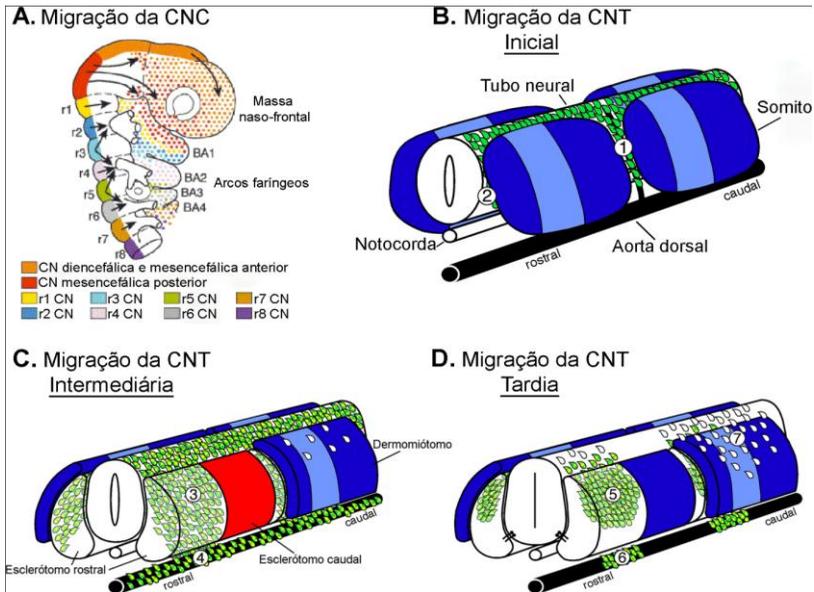


Figura 2: Mapa das rotas migratórias da Crista Neural Cefálica (CNC) e da Crista Neural Truncal (CNT). (A) A migração das células da CNC ocorre essencialmente numa camada situada sob o ectoderma. São mostrados os fluxos migratórios no eixo ântero-posterior. As células da CNC colonizam a massa naso-frontal e os arcos faríngeos conforme a altura em que se originam no embrião (Adaptado de Le Douarin e Kalcheim, 1999). (B-D) Rotas de migração da CNT. Durante a migração inicial, as células da CN migram ventralmente por entre os somitos (B1), e por entre os somitos e o tubo neural (B2). Na fase intermediária da migração, células da CN migram ventrolateralmente invadindo apenas o esclerótomo rostral (C3), com algumas células da CN continuamente passando pelos somitos para se juntarem na aorta dorsal, onde se dispersam ao longo de seu comprimento (C4). Nos camundongos, algumas células da CN migram dorsolateralmente sobre o dermomiótomo já nesta fase, enquanto que nas aves esta via ainda não ocorre. Na migração tardia, as células da CN na região dos somitos se condensam em gânglios da raiz dorsal (D5), enquanto aquelas na aorta dorsal formam os gânglios simpáticos (D6). O caminho dorsolateral inicia-se no final da migração e as células da CN começam a migrar ao longo dos dermomiótomos (D7) (Adaptado de Gammill e Roffers-Agarwal, 2010).

Na região truncal, as células da CN migram por diversas vias. Algumas dessas células migram por entre os somitos até alcançar a aorta dorsal, e tornam-se neurônios e células gliais dos gânglios simpáticos, bem como células cromafins adrenais. Em outra via, as células da CN passam pelo esclerótomo e também contribuem para os gânglios simpáticos, enquanto células que permanecem no esclerótomo formam neurônios sensoriais e glias do gânglio de raiz dorsal, e células de Schwann das raízes ventrais (Kasemeier-Kulesa *et al.*, 2005; Serbedzija *et al.*, 1990; Teillet *et al.*, 1987). Já as células que adotam uma rota dorsolateral, entre a derme e a epiderme, e se instalam sob o ectoderma, dão origem aos melanócitos da pele (Le Douarin e Kalcheim, 1999) (Figura 2B).

## 1.2. POTENCIALIDADE DAS CÉLULAS DA CN

Estudos de rastreamento celular *in vivo*, por transferência gênica ou retrovírus (Bronner-Fraser e Fraser, 1989; Frank e Sanes, 1991) e estudos de clonagem celular (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2007), revelaram que as células da CN dão origem a vários tipos de células, incluindo neurônios, células gliais, células musculares lisas e melanócitos. A ampla capacidade de diferenciação das células da CN deve-se a sua heterogeneidade que inclui células altamente multipotentes, células oligopotentes e progenitores já comprometidos com uma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M), células musculares lisas (F), condrócitos (C) e osteócitos (O) (Trentin *et al.*, 2004; Calloni *et al.*, 2009).

Dois modelos têm sido propostos para explicar a origem da diversidade das células da CN. O primeiro sugere que essas células permaneçam multipotentes até que sejam especificadas por sinais provenientes do ambiente em que migram. O modelo alternativo sugere que as células da CN já estão especificadas para diferenciar em linhagens distintas no momento em que se tornam células da CN, ou antes de se dispersarem através do corpo. No entanto, ao invés de serem excludentes, ambos os modelos juntos podem explicar melhor como as células da CN podem dar origem a diversos tipos celulares, de forma coordenada (Ruhrberg e Schwarz, 2010).

Os primeiros experimentos demonstrando a multipotencialidade das células da CN foram realizados *in vitro* a partir de embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*), analisando-se o potencial de desenvolvimento das células da CN por meio de clonagem celular (Cohen e Konigsberg, 1975). Nesses experimentos, células isoladas

deram origem a três tipos de clones: (1) clones contendo somente melanócitos; (2) clones contendo somente neurônios adrenérgicos, e (3) clones contendo os dois tipos celulares. Já a primeira evidência da existência de precursores comuns entre linhagens neurais e mesectodermiais da CNC foi obtida por Baroffio e colaboradores em 1991, com a identificação de um precursor multipotente comum para glia, neurônio, melanócito e condrócito (GNMC). Porém, em trabalho recente publicado por Calloni e colaboradores (2009) foi demonstrada a existência de um progenitor multipotente capaz de originar glia, melanócito, neurônio, célula de músculo liso, condrócito e osteócito (Figura 3A). Esse progenitor hexapotente é um candidato a ser considerado uma célula tronco da CN, porém, ainda são necessários estudos que demonstrem sua capacidade de autorrenovação, ou seja, de gerar ele mesmo e também uma progênie diferenciada.

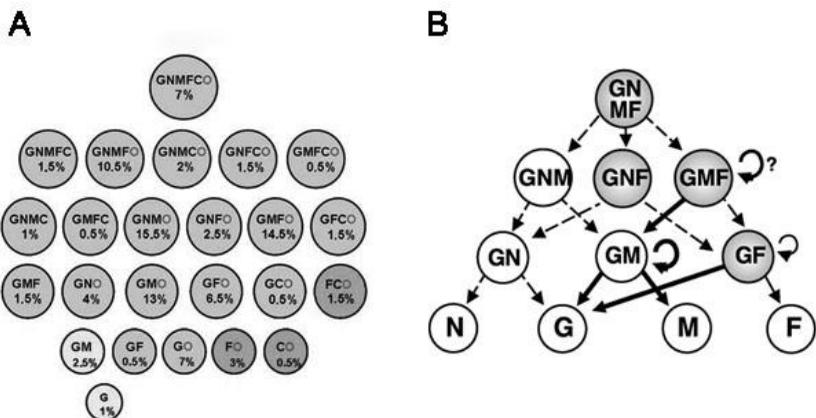


Figura 3: Modelo da segregação da linhagem celular na CN cefálica (A) e truncal (B). Progenitores são classificados de acordo com o potencial de desenvolvimento e identificados por clonagens celulares. As células multipotentes da CN de codornas sofrem restrições progressivas em sua potencialidade, produzindo precursores intermediários oligopotentes, e progenitores já comprometidos com uma linhagem celular, que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M), células de músculo liso (F), condrócitos (C) e osteoblastos (O). (Adaptado de Calloni *et al.*, 2009 e Trentin *et al.*, 2004)

A primeira evidência de que alguns progenitores da CN são capazes de se autorrenovarem *in vitro*, foi demonstrada por Stemple e Anderson em 1992, através de ensaios clonais conduzidos com a CNT

de ratos e camundongos. Já em 2004, Trentin e colaboradores verificaram em aves que os progenitores bipotentes glia-melanócito (GM) e glia-músculo liso (GF) também possuem a capacidade de autorrenovação, desse modo apresentando todas as propriedades de células tronco (Figura 3B). Em trabalho ainda não publicado do nosso laboratório, foi demonstrado, por meios de ensaios de subclonagens, que também os progenitores GF e possivelmente GMF se autorrenovam *in vitro* (Bittencourt *et al.*, em redação) estimulados por FGF2.

O microambiente em que os progenitores da CN se encontram durante e após sua migração influenciam fortemente seu destino fenotípico, como demonstrado por experimentos em que os subdomínios da CN foram transplantados em diversas posições ao longo do eixo ântero-posterior de embriões de aves (Le Douarin e Kalcheim, 1999; Dupin *et al.*, 2010). Esses resultados vêm sendo confirmados por estudos *in vitro*. Um dos fatores responsáveis por controlar o destino de diferenciação celular dos progenitores multipotentes da CN são as moléculas de matriz extracelular (MEC). Trabalho recente do nosso laboratório mostrou que a MEC influencia a proliferação e diferenciação das células da CN de modo similar em aves e mamíferos. Através de análises clonais de células da CNT demonstrou-se que a fibronectina induz o aumento da proporção de progenitores unipotentes e oligopotentes com potencial para o desenvolvimento de células de músculo liso (Costa-Silva *et al.*, 2009).

Além da MEC, outros trabalhos indicam que fatores solúveis também podem ser responsáveis por controlar o destino de diferenciação dos progenitores multipotentes da CN. Dentre os fatores extracelulares mais estudados que influenciam na especificação da CN podem-se destacar membros da família Wnt na diferenciação de melanócitos (Dorsky, Moon *et al.*, 1998), fator de crescimento de nervo (NGF), FGF e BMP na diferenciação de linhagens neuronais (Reissmann *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999; Forander *et al.*, 2001, Garcez *et al.*, 2009), neuregulina-1 (NRG1), ligantes de *Notch* e FGF2 na diferenciação de células gliais (Shah *et al.*, 1994; Garcez *et al.*, 2009), fator de crescimento transformante beta (TGFB) na diferenciação de músculo liso (Li, Luo *et al.*, 2007) e Sonic Hedgehog (Shh) na diferenciação de condrócitos (Brito *et al.*, 2006; Calloni *et al.* 2007).

### 1.3. MELANÓCITOS DERIVADOS DA CN

Os melanócitos, com exceção dos presentes no epitélio pigmentar da retina, são células especializadas, derivadas da CN, que possuem a capacidade de sintetizar o pigmento melanina (Osawa, 2009). A

especificação dos melanócitos ocorre devido a uma mudança no perfil de expressão gênica dessas células. Diversos fatores de transcrição desempenham papel importante na regulação dos genes responsáveis pela melanogênese. Estes incluem o fator de transcrição associado à microftalmia (Mitf), Pax3, e Sox10. A perda de qualquer um dos três resulta em falha do desenvolvimento dos melanócitos. Embora Pax3 e Sox10 sejam claramente necessários para a especificação dos melanoblastos, Mitf é referido como o regulador mestre da melanogênese (Thomas e Erickson, 2008) (Figura 4).

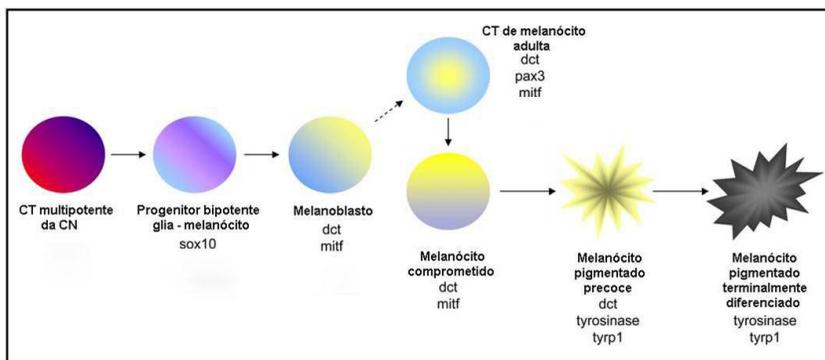


Figura 4: Diferenciação de melanócitos da crista neural. A restrição de linhagem gradual em direção ao melanoblasto depende de Mitf. O melanoblasto embrionário e a célula-tronco de melanócito adulta compartilham alguns marcadores, particularmente *dct*. Não está claro se alguma célula tronco de melanócito adulta surja independentemente dos melanoblastos embrionários (seta tracejada). A síntese de melanina é regulada pelas enzimas tirosinase, Trp1 e Dct. (Adaptado de White e Zon, 2008)

Os melanócitos se diferenciam a partir de precursores imaturos, os melanoblastos da CN, que migram do tubo neural dorsolateralmente por entre os somitos e a ectoderme, e posteriormente invadem a ectoderme onde se diferenciam (Le Douarin e Kalcheim, 1999) (Figura 2, D7). A síntese de melanina ocorre em organelas especializadas chamadas de melanossomos, a partir da tirosina, e é catalisada pelas enzimas: tirosinase, proteína relacionada à tirosinase-1 (Trp1) e dopacromo tautomerase (Dct ou Trp2) (Słominski *et al.*, 2004). Segundo Hulley e colaboradores (1991), em embriões de aves a síntese de melanina ocorre desde o quinto dia de vida.

A proliferação e diferenciação dos melanócitos são reguladas por numerosos fatores genéticos e epigenéticos (Hirobe, 1992). Dentre os

fatores epigenéticos pode-se citar a radiação ultravioleta (UV), hormônios, como o hormônio alfa estimulador de melanócito ( $\alpha$ -MSH), e alguns fatores de crescimento, como o fator de crescimento de célula germinativa (*stem cell factor*, SCF), o fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*, HGF) e a endotelina-3 (ET3) (Hirobe, 2011). A ET3 além de estimular a diferenciação de melanócitos é ainda capaz de estimular a proliferação e sobrevivência do progenitor bipotente gliamelanócito (Lahav *et al.*, 1996; Lahav *et al.*, 1998; Trentin *et al.*, 2004).

Diversos marcadores têm sido utilizados para identificar os melanócitos derivados da CN e seus precursores. Dentre eles podemos citar o marcador precoce de melanoblastos/melanócitos (MeEM). Em aves, o antígeno reconhecido pelo MeEM aparece no 3º dia de cultura secundária, sendo encontrado em todas as células melanocíticas derivadas de CN em diferenciação. Tanto em cultura quanto *in vivo* a expressão desse antígeno precede o início da síntese de pigmentos e permanece presente quando a pigmentação aparece. Assim, o MeEM pode ser considerado marcador tanto de melanoblastos, quanto de melanócitos diferenciados terminalmente (Nataf *et al.*, 1993).

#### 1.4. FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um polipeptídeo constituído por 53 resíduos de aminoácidos, e que possui um importante papel nos processos do desenvolvimento. Esse fator estimula a proliferação de uma grande variedade de células, incluindo precursores neurais *in vitro* (Kilpatrick e Bartlett, 1995) e células tumorais. Receptores de EGF (EGFR) estão presentes em altos níveis em tumores de cabeça e pescoço, como neuroblastoma periférico, o qual é um tipo de tumor derivado de células da CN (Ho *et al.*, 2005). Segundo Yoon e colaboradores (2000) o EGF exógeno promove a proliferação de osteoblastos e inibe a diferenciação osteogênica e condrogênica em broto de membros de aves. Segundo esses estudos, a expressão de receptores de EGF, em tempos distintos do desenvolvimento, causa diversos defeitos na morfogênese do membro, incluindo formação ectópica da crista ectodérmica apical, polidactilia e sindactilia.

Além disso, estudos com células de timo murínico, que também são derivadas de CN, demonstram que o EGF promove o aumento do número de células positivas para neurofilamento e estimula o aparecimento de outros marcadores neuronais, como tirosina hidroxilase, sinapsina 1 e enolase neurônio-específica. Esse fator de crescimento pode estar atuando na via de diferenciação neuronal,

promovendo a expressão de genes específicos (Screpanti *et al.*, 1995; Giannini *et al.*, 2001).

Outros trabalhos relacionam o EGF e seu receptor com o desenvolvimento da CN. Segundo Golding e colaboradores (2000) a expressão de receptores de EGF está relacionada com a determinação da via de migração das células da CNC, tendo ratos *knockout* para esses receptores apresentado migração anormal dessa população celular, com consequentes defeitos faciais incluindo estreitamento facial, focinho alongado, mandíbula pouco desenvolvida e uma elevada incidência de fenda palatina (Miettinen *et al.*, 1999). Trabalhos realizados por Erickson e Turley (1987) sugerem ainda que o EGF esteja envolvido na secreção de proteoglicanos por células da CNT de codornas *in vitro*.

Fuchs e colaboradores (2009) monitoraram a expressão do EGFR tanto *in vivo* quanto *in vitro* nas células da CN, no modelo de camundongos, e demonstraram que no estágio embrionário 9,5 (E9,5) a expressão desse receptor é baixa. Já no estágio E10,5, a expressão apesar de relativamente fraca e heterogênea, torna-se aparente no gânglio de raiz dorsal, no intestino e no primeiro arco faríngeo, tornando-se forte no estágio 11,5. Porém, no modelo de aves ainda não se sabe como funciona o padrão de expressão do EGFR.

Em estudo recente realizado por nosso grupo demonstramos que o EGF tem um importante papel no processo de diferenciação de células da CNT para neurônios e melanócitos, enquanto o FGF2 atua na diferenciação para o fenótipo glial. Porém, quando tratamos as células com FGF2 e EGF concomitantemente, não observamos o mesmo padrão de indução do FGF2 para o fenótipo glial, nem o de indução do EGF para o fenótipo melanocítico. Esses resultados indicam que o EGF possivelmente atua como um antagonista do efeito pró-gliogênico do FGF2, e o FGF2 como antagonista do efeito pró-melanogênico do EGF. Um fato interessante encontrado é que o EGF, mesmo em presença de FGF2, é ainda capaz de determinar a diferenciação neurogênica nas mesmas proporções. Nesse caso, a ação do EGF não é bloqueada pelo FGF2, como no caso do fenótipo melanocítico, sugerindo um mecanismo regulatório distinto do EGF sobre a diferenciação neuronal (Garcez *et al.*, 2009; Teixeira, 2009).

Considerando que a população de células da CN é heterogênea, com progenitores de diversas potencialidades, nossos dados sugerem que esses fatores podem estar atuando de maneira competitiva em uma célula progenitora mista, possivelmente glia-melanócito. O EGF possivelmente atua também em um progenitor não responsivo ao FGF2, envolvido com diferenciação neurogênica (Garcez *et al.*, 2009; Teixeira,

2009). Porém, para reais afirmações a respeito da influência do EGF sobre os progenitores da CNT eram necessários experimentos de clonagens celulares, um dos objetivos do presente trabalho.

### 1.5. JUSTIFICATIVA

Apesar de muito estudado em vários sistemas biológicos, e de alguns estudos envolverem células derivadas de CN, ainda não é claro na literatura o exato envolvimento do EGF nos processos de diferenciação das células da CN, nem em que progenitores esse fator pode atuar. O conhecimento sobre como esse fator interfere na morfogênese e no potencial plástico dessas células é de fundamental importância para entendermos mais sobre a biologia das células da CN.

Devido à variedade da progênie da CN, muitos defeitos congênitos, doenças familiares e neoplasias são derivados dessa população celular. Alguns exemplos incluem defeitos cardíacos congênitos, fissura labial/fenda palatina, doença de Hirschsprung, neurofibromatose, neuroblastoma e melanoma (Etchevers, Amiel e Lyonnet, 2006). Elucidar os mecanismos que regulam a diferenciação das células da CN é o primeiro passo para uma futura aplicação terapêutica nessas patologias derivadas da CN. Estes estudos podem levar à concretização de abordagens tais como o recrutamento e diferenciação de células tronco armazenadas em um tecido, ou até mesmo conversão de células já diferenciadas de um determinado tipo para um diferente fenótipo funcional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ação do fator de crescimento EGF sobre a potencialidade e a diferenciação das células da CN de embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*).

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) no estágio de desenvolvimento de 5-7 somitos para culturas de células de CNC e de 20-25 somitos para CNT. Os ovos fertilizados foram obtidos no biotério do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina, onde os animais foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 17 h/7 h, possuindo água e ração *ad libitum*. O período de incubação dos ovos foi de 30 ou 48 h a 37,5°C em chocadeira com umidade relativa de 65%.

A utilização destes animais está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 09 de julho de 2007, sob o protocolo de pesquisa/ensino número PP00103/CEUA/UFSC.

#### 3.2. CULTURA DE CÉLULAS DA CN DE CODORNAS

##### 3.2.1. Cultura de células da CNC de codornas

Para a realização de experimentos com a CNC, tubos neurais no estágio de 5-7 somitos foram isolados entre a região mesencefálica até o 4° par de somitos (ao nível do rombômero 8) (Figura 5). Estes explantes foram dissociados em solução de pancreatina (6,25 g/L, Sigma) com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio e colocados em placas de cultura de 35mm (Corning, NY, USA) revestidas com colágeno tipo I (Sigma) (50 µg/mL), conforme instruções do fabricante. Os tubos neurais foram mantidos por 15 h em meio de cultura composto por alfa-MEM (Gibco), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 µg/mL, Gibco), em estufa úmida (95%) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.2. Cultura de células da CNT de codornas

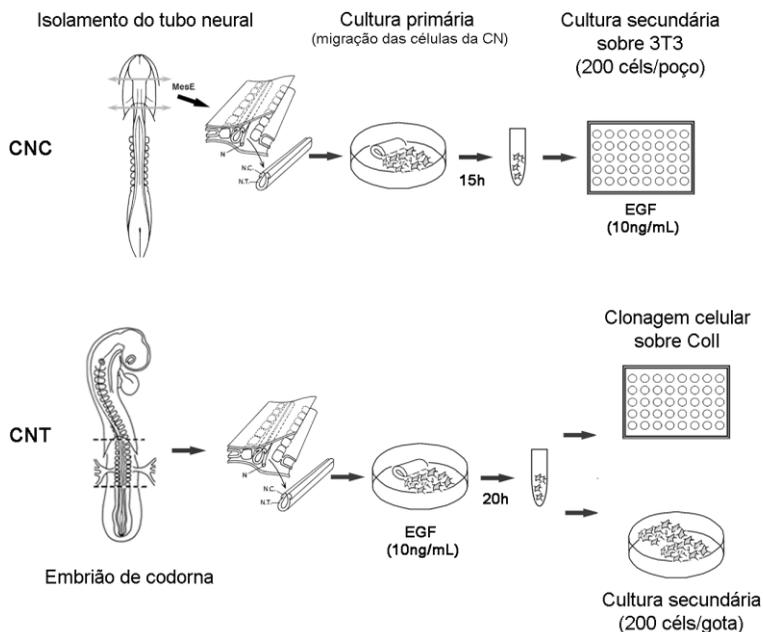
Para as culturas de CNT, foram utilizados embriões de codornas no estágio de 20-25 somitos, sendo os ovos incubados por 48 h a 37,5°C (Figura 5). Os procedimentos de isolamento foram adotados tal como descrito para cultura de células da CNC. Os tubos isolados foram colocados diretamente sobre placas de plástico (Corning - 35 mm) e mantidos por 20 h em meio de cultura alfa-MEM (Gibco), contendo 10% de SFB (Cultilab), 2% de EE, penicilina (200 U/mL, Gibco) e

estreptomicina (10 µg/mL, Gibco). As culturas permaneceram em estufa úmida à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico.

### 3.2.3. Cultura secundária e clonagens celulares

Após os períodos de migração em cultura primária descritos acima, os explantes do tubo neural foram removidos e descartados (Figura 5). As células remanescentes, que correspondem às células da CN, foram tripsinizadas com solução de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA) (Sigma), e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10% de SBF seguido de centrifugação (500 X g por 10 min). Para as culturas de massa as células foram ressuspensas e semeadas em gotas de 30µl contendo 200 células, em placas de 96 poços (Corning). Nas culturas de células da CNC, essas foram semeadas sobre monocamadas de fibroblastos embrionários de camundongos Swiss 3T3 (Barrandon e Green, 1985) em uma densidade de 24.000 células/poço. As células 3T3 tiveram a proliferação inibida pela adição do antibiótico mitomicina (5 µg/mL, Sigma) por 4h a 37°C (Baroffio *et al.*, 1988), com 24 h de antecedência em relação à semeadura das células da CN. As culturas de células da CNC foram mantidas por 10 dias em meio composto por alfa-MEM, contendo 10% de SFB, penicilina e estreptomicina. Já as culturas de células da CNT foram mantidas por 5 dias em um meio complexo composto por alfa-MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY), contendo 10% SFB (Cultilab), 2% de EE, hidrocortisona (0,1µg/mL, Sigma), transferrina (10 µg/mL, Sigma), insulina (1 ng/mL, Sigma), 3-3'-5 triiodo-L-thironina (T3) (0,4 ng/mL, Sigma), glucagon (0,01 ng/mL, Sigma), EGF (0,1ng/mL, Sigma), FGF2 (1 ng/mL, Sigma), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 µg/mL, Gibco), em estufa úmida (95%) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Para a realização das culturas clonais (Figura 5), as células da CNT foram semeadas individualmente com auxílio de micropipetas e sob controle microscópico em placas de 96 poços (Corning) (Dupin *et al.* 2007), previamente revestidas com colágeno tipo I (Sigma) (50 µg/mL), conforme instruções do fabricante. Os clones foram mantidos por 10 dias em meio complexo, descrito anteriormente, em estufa úmida à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, e houve troca de meio de cultivo a cada três dias. Em seguida os clones foram fixados e submetidos à imunocitoquímica, a fim de avaliar o potencial da célula fundadora do clone. Dessa maneira avaliamos o efeito do EGF sobre a potencialidade das células da CNT.



**Figura 5: Esquema representativo da Metodologia a ser utilizada para as culturas de células de CNC e CNT de embrião de aves.** Primeiramente os tubos neurais foram isolados, dissecados e plaqueados em placas de 35mm. As células da CN migraram por 15h (CNC) ou 20h (CNT), sendo em seguida recuperadas e plaqueadas para posterior cultura secundária (Adaptado de Dupin *et al.*, 2010). As culturas de massa de células da CNC foram mantidas sobre 3T3 em colágeno tipo I, em uma densidade de 200 células/poço em placas de 96 poços. Já as culturas de massa das células da CNT foram mantidas sobre plástico, plaqueadas em gotas de 30 $\mu$ L contendo 200 células. Para os ensaios de clonagem celular, cada célula foi individualmente semeada por poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno tipo I.

### 3.3. TRATAMENTO DAS CULTURAS CELULARES COM EGF

O EGF (10ng/mL; Sigma) foi adicionado ao meio de cultura e o tratamento das células da CNT realizou-se durante a fase de migração dessas células a partir do tubo neural (cultura primária) (Figura 5). Após o período de tratamento os meios de cultura foram trocados, e as culturas foram mantidas nos respectivos meios descritos no tópico 3.2. Já nas culturas de células da CNC os tratamentos foram realizados durante toda a fase de diferenciação celular (cultura secundária) (Figura 5).

### 3.4. ANÁLISE FENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA

A análise fenotípica foi avaliada por imunocitoquímica para fluorescência, utilizando-se marcadores específicos para os vários fenótipos celulares derivados da CN. As culturas foram fixadas com paraformaldeído (PF) a 4% durante 30 min, em seguida permeabilizadas com solução de PBS-Triton X-100 (Sigma) (0,25%) por 30 min, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB diluído em PBS (NaCl, 8 g/L; KCl, 0,09 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/L) durante 30min. As células foram incubadas, *overnight* a 4°C, com anticorpos primários específicos para os diferentes fenótipos que a CN pode originar, conforme especificado na Tabela 1. Os melanócitos foram identificados por microscopia de contraste de fase pela presença do pigmento melanina, além do marcador MeEM (Tabela 1) (Nataf *et al.*, 1993). As células foram então lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) (Sigma) por 5 min, e subsequentemente incubadas por 1 h, a temperatura ambiente, com os anticorpos secundários desenvolvidos em cabra contra IgM de camundongo conjugado a Texas red (TxRed), contra IgG2a de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), contra IgG1 de camundongo conjugado a FITC e contra IgM de camundongo conjugado a FITC (Tabela 1). As células foram então novamente lavadas com PBS e incubadas com corante fluorescente nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido – DAPI (1mg/ml; Sigma).

Para análise da expressão do receptor de EGF foi utilizado o anticorpo primário anti-EGFR, seguido do anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a biotina (Invitrogen, 1:150), e incubação com estreptavidina conjugada à peroxidase (1:150, 30 min; PerkinElmer) e tiramida (1:200, 10 min.; PerkinElmer) para amplificação da fluorescência.

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

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Alvo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
Anti-Tubulina $\beta$ -III (IgG1)	Neurônio	Promega	1:1000
Anti-Actina de músculo liso (IgG2a)	Músculo liso	Sigma	1:500
Anti-HNK1 (IgM)	Célula glial	Developmental Studies Hybridoma Bank	Sobrenadante não diluído
Anti-Marcador precoce de melanoblastos/melanócitos (IgG1)	Melanócito	Developmental Studies Hybridoma Bank	Sobrenadante não diluído
Anti-Sulfato de condroitina (IgM)	Cartilagem	Sigma	1:1600
Anti-Receptor do fator de crescimento epidermal (IgG1)	EGFR	Abcam	1:100
<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Conjugação</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
Anti-IgM de camundongo	TxRed	Southern Biotech	1:75
Anti-IgG2a de camundongo	FITC	Southern Biotech	1:75
Anti-IgG1 de camundongo	FITC	Southern Biotech	1:75
Anti-IgM de camundongo	FITC	Southern Biotech	1:75
Anti-IgG1 de coelho	Biotina	Invitrogen	1:150

As placas foram observadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) e fotografadas em câmara (Olympus DP71). Para as culturas em massa, foram analisadas pelo menos 15 diferentes campos por condição de experimento em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos por campos do microscópio, e as proporções dos fenótipos foram analisadas pela relação entre o número total de células e o número de células positivas para os marcadores analisados. As análises dos clones foram realizadas em 3 experimentos independentes, em microscópio epifluorescente, sendo que em cada clone presente foi avaliada a expressão dos marcadores fenotípicos. A identidade do progenitor (célula fundadora da colônia) foi confirmada *a posteriori* pelo conjunto de fenótipos celulares presentes no clone. Para análise dos tamanhos, foi estimado o número de células presentes em cada clone através da visualização dos núcleos por coloração com DAPI.

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA

A relação entre a marcação de MeEM e a presença de melanina, foi realizada por quantificação densitométrica das áreas e da intensidade das marcações, através do *software* ImageJ (National Institutes of Health).

### 3.6. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE EGF (EGFR)

Para análise da expressão do EGFR, a partir de culturas de CNT descritas anteriormente, foram feitas extrações de RNA total após 20h de cultura. Para isso, o meio de cultura foi removido das placas de 35mm e as mesmas foram lavadas com PBS1X. Para controle positivo da expressão de EGFR foram utilizados embriões de codorna com 48h de incubação. O RNA total destas amostras foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante. Para eliminar possíveis resquícios de DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase RQ1 (Promega), de acordo com instruções do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 1µg do RNA total através do Kit para transcrição reversa *ImProm Reverse Transcriptase* (Promega), conforme especificações do fabricante. Para a técnica de PCR foi utilizado o cDNA sintetizado pela técnica da transcriptase reversa. Para o estudo da expressão do *EGFR* foi utilizado 1µL de cada iniciador (10µM), senso e anti-senso, específicos para esta reação conforme tabela 2, e 1 µl de





## **4. RESULTADOS**



## **5. DISCUSSÃO**



## 6. CONCLUSÕES

- Populações de células da CNT expressam o receptor de EGF após 20h de migração a partir do tubo neural.
- Apesar de descrito na literatura como um inibidor da diferenciação de condrócitos de broto de membros de aves, o EGF parece não ser capaz de inibir a diferenciação dos condrócitos derivados da CNC.
- O EGF não influencia a potencialidade nem a proliferação dos progenitores derivados da CN.
- O EGF não afeta a proliferação de melanócitos e melanoblastos em culturas de CNT.
- O EGF exerce um importante papel na diferenciação de melanócitos derivados da CN possivelmente atuando na síntese de melanina.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAROFFIO, A.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. M. Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 14, p. 5325-5329, 1988.
- BAROFFIO, A.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. M. Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. **Development**, v. 112, n. 1, p. 301-305, 1991.
- BITTENCOURT, D. A. **Efeito do FGF2 na diferenciação de células da crista neural truncal (CNT) de codornas in vitro**. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BRITO, J. M.; TEILLET, M.-A.; LE DOUARIN, N. M. An early role for Sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: Ensuring neural crest cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 31, p. 11607-11612, 2006.
- BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. **Neuron**, v. 3, n. 6, p. 755-766, 1989.
- CALLONI, G. W. et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19879-19884, 2007.
- CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 8947-8952, 2009.
- COHEN, A. M.; KONIGSBERG, I. R. A clonal approach to the problem of neural crest determination. **Developmental Biology**, v. 46, n. 2, p. 262-280, 1975.

COSTA-SILVA, B. et al. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential.

**Experimental Cell Research**, v. 315, n. 6, p. 955-967, 2009.

COULY, G. et al. The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. **Development**, v. 122, n. 11, p. 3393-3407, 1996.

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

DUPIN, E. et al. Neural crest progenitors and stem cells. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, n. 6-7, p. 521-529, 2007.

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.

ERICKSON, C. A.; TURLEY, E. A. The effects of epidermal growth factor on neural crest cells in tissue culture. **Experimental Cell Research**, v. 169, n. 2, p. 267-279, 1987.

ETCHEVERS, H.; AMIEL, J.; LYONNET, S. Molecular Bases of Human Neurocristopathies. In: SAINT-JEANNET, J.-P. (Ed.). **Neural Crest Induction and Differentiation**: Springer US, v.589, p.213-234, 2006.

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

FRANK, E.; SANES, J. R. Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus. **Development**, v. 111, n. 4, p. 895-908, 1991.

FUCHS, S. et al. Stage-Specific Control of Neural Crest Stem Cell Proliferation by the Small Rho GTPases Cdc42 and Rac1. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 236-247, 2009.

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

GARCEZ, R. et al. Epidermal Growth Factor (EGF) Promotes the In Vitro Differentiation of Neural Crest Cells to Neurons and Melanocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087-1091, 2009.

GIANNINI, G. et al. EGF Regulates a Complex Pattern of Gene Expression and Represses Smooth Muscle Differentiation during the Neurotypic Conversion of the Neural-Crest-Derived TC-1S Cell Line. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 2, p. 353-362, 2001.

GOLDING, J. P. et al. Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 103-109, 2000.

GRAHAM, A. The neural crest. **Current Biology**, v. 13, n. 10, p. R381-R384, 2003.

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

HIROBE, T. Melanocyte stimulating hormone induces the differentiation of mouse epidermal melanocytes in serum-free culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 152, n. 2, p. 337-345, 1992.

HIROBE, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 462-478, 2011.

HO, R. et al. Proliferation of Human Neuroblastomas Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor. **Cancer Research**, v. 65, n. 21, p. 9868-9875, 2005.

KASEMEIER-KULESA, J. C.; KULESA, P. M.; LEFCORT, F. Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. **Development**, v. 132, n. 2, p. 235-245, 2005.

KILPATRICK, T.; BARTLETT, P. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 3653-3661, 1995.

KONTGES, G.; LUMSDEN, A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. **Development**, v. 122, n. 10, p. 3229-3242, 1996.

LAHAV, R. et al. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 9, p. 3892-3897, 1996.

LAHAV, R. et al. Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14214-14219, 1998.

LE DOUARIN, N.M.; KALCHEIM, C. *The Neural Crest*. 2 Ed. New York: Cambridge Univ. Press, 1999.

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

LI, F. et al. Response Gene to Complement 32, a Novel Regulator for Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Smooth Muscle Differentiation of Neural Crest Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10133-10137, 2007.

LILLIEN, L.; RAPHAEL, H. BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. **Development**, v. 127, n. 22, p. 4993-5005, 2000.

MIETTINEN, P. J. et al. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. **Nat Genet**, v. 22, n. 1, p. 69-73, 1999.

NATAF, V. et al. Novel Markers of Melanocyte Differentiation in the Avian Embryo. **Experimental Cell Research**, v. 207, n. 1, p. 171-182, 1993.

NONAKA K, SHUM L, TAKAHASHI I, TAKAHASHI K, IKURA T, DASHNER R, NUCKOLLS GH, SLAVKIN HC. Convergence of the BMP and EGF signaling pathways on Smad1 in the regulation of chondrogenesis. **Int J Dev Biol.**, n. 43, v. 8, p. 795-807, 1999.

OSAWA, M. Melanocyte stem cells. **StemBook**. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008-2009.

REISSMANN, E. et al. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. **Development**, v. 122, n. 7, p. 2079-2088, 1996.

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

SCHNEIDER, C. et al. Bone Morphogenetic Proteins Are Required In Vivo for the Generation of Sympathetic Neurons. **Neuron**, v. 24, n. 4, p. 861-870, 1999.

SCREPANTI, I. et al. Epidermal growth factor promotes a neural phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. **The Journal of Cell Biology**, v. 130, n. 1, p. 183-192, 1995.

SERBEDZIJA, G. N.; FRASER, S. E.; BRONNER-FRASER, M. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. **Development**, v. 108, n. 4, p. 605-612, 1990.

SHAH, N. M. et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 349-360, 1994.

SHUM, L. et al. EGF abrogation-induced fusilli-form dysmorphogenesis of Meckel's cartilage during embryonic mouse mandibular morphogenesis in vitro. **Development**, v. 118, n. 3, p. 903-917, 1993.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, 2004.

TANEYHILL, L. A. To adhere or not to adhere: The role of Cadherins in neural crest cell development. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 4, p. 223-230, 2008.

TEILLET, M.-A.; KALCHEIM, C.; LE DOUARIN, N. M. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. **Developmental Biology**, v. 120, n. 2, p. 329-347, 1987.

TEIXEIRA, B. L. **Efeitos do EGF e do FGF2 sobre a diferenciação das células da crista neural truncal de codornas, in vitro**. 2009. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 6, p. 598-610, 2008.

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

TRENTIN, A. et al. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

WHITE, R. M.; ZON, L. I. Melanocytes in development, regeneration, and cancer. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 242-252, 2008.

WONG, R. W. C.; GUILLAUD, L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 147-156, 2004.

YOON, Y.-M. et al. Epidermal Growth Factor Negatively Regulates Chondrogenesis of Mesenchymal Cells by Modulating the Protein Kinase C- $\alpha$ , Erk-1, and p38 MAPK Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 12353-12359, 2000.