



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA**

Bruna Hilzendeger Marcon

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-
TRONCO OBTIDAS DE FOLÍCULOS PILOSOS DE
CAMUNDONGOS E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA
DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS EPIDERMIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
obrigatório para obtenção do grau de Bacharelado

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin

Co-orientadora: Ma.Talita da Silva Jeremias

Florianópolis, 2011

Bruna Hilzendeger Marcon

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-
TRONCO OBTIDAS DE FOLÍCULOS PILOSOS DE
CAMUNDONGOS E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA
DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS EPIDERMIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito obrigatório
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Data da aprovação: 02/09/2011

A banca examinadora atribuiu nota à aluna Brunna Hilzendeger
Marcon na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (BIO 7016) pela
apresentação deste Trabalho

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Andréa Gonçalves Trentin

Prof.^a Dr.^a Margherita Barracco

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni

Ma. Denise Bittencourt

*A todas as pessoas que fazem da
minha vida algo especial*

*On ne voit bien qu'avec le coeur.
L'essentiel est invisible pour les yeux.*
Le Petit Prince

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Andréa, por me abrir as portas para o mundo da ciência, pela paciência e confiança depositadas e por todo o conhecimento que eu recebi nos últimos anos.

À Talita, que me recebeu com um grande sorriso e braços abertos quando eu fui morrendo de medo pedir para ser minha co-orientadora. Muito obrigada pela incrível amizade, por todo o conhecimento que você me transmitiu, pela paciência, apoio - mesmo quando eu resolvi largar tudo e ir para o outro lado do oceano – e por ter, inúmeras vezes, aguentado o meu mau humor e segurado as pontas para mim. Agradeço pelas nossas longas conversas, que iam de células-tronco a desventuras amorosas, e por dizer sempre a verdade, por mais dolorida que fosse. Obrigada por ter sido peça fundamental do meu amadurecimento profissional e pessoal nos últimos anos. Você é e sempre será minha referência.

Aos professores Giordano, Cláudia e Ricardo, por toda atenção e respeito ao longo destes anos, pelas dúvidas tiradas e por serem exemplo do que é a paixão pela ciência.

Ao pessoal do laboratório (e ex-laboratório), Aloísio, Ana, Anna Chica, Bibiane, Bianka, Camila, Ciça, Diana, Fernanda, Lucas, Marcos dos Anjos, Rafa, Sarah e Sílvia. Em especial, ao New, por ter me recebido no laboratório e ajudado enquanto eu ainda estava “engatinhando” na ciência. E também pelos nossos emocionantes campeonatos de “pião” (por pião, leia-se: ultrafiltro usado) e poker durante os intervalos de imuno e PCR. À Bianca, pela amizade e pelo exemplo de espírito trabalhador (que fazia até eu me sentir mal, e achar que eu era a pessoa mais preguiçosa do mundo!). À Zucco, que me fez descobrir que podemos rir muito ao tirar fotos de um caneco e que, ao contrário da Bi, me fazia achar que eu era a pessoa mais trabalhadora do mundo (desculpa, Zucco, eu não podia perder a piada). À Suelen, pela amizade, pelas risadas e pelos maravilhosos *petits gâteaux*. À Meline, pelo carinho, pelas idéias alternativas (sempre motivo de uma gostosa conversa) e por me ensinar que, quando acaba a energia elétrica, é só abrir a geladeira que lá vai ter luz! À Bia, pela amizade e disposição em

sempre ajudar. Ao Raul, parceiro de laboratório e de viagem, que literalmente correu comigo pelas ruas de Praga, dormiu no banco da rodoviária de Berlim e me emprestou uma camiseta para eu usar de fronha no super hostel de Londres. Ótimas lembranças! Ao Diego, pela amizade, pelas piadas engraçadíssimas e cantadas ordinárias, e por me ter feito ficar preocupada porque estacionei minha “vassoura” no lugar errado (isso ainda vai ter volta!). À Denise e à Mari, pelo companheirismo diário. À Addeli, pela alegria, sinceridade e por ter me ensinado como entrar com classe em uma limosine.

Aos educadores, Ademir Reis, Carlos Pinto, Daniela de Toni, Margherita Barracco, Natália Hanazaki, Paulo Hofmann e Paulo Simões Lopes, por todo conhecimento e amor à profissão transmitidos.

Aos meus amigos da faculdade (e anexos), Cecília, Fernando, Kamille, Indy, Ingrid, Lauro, Lu, Richard, Tefa e Thais. Agradeço pela amizade incondicional, pelas inúmeras aventuras juntos, pelo desespero compartilhado nas vésperas de prova, pelas saídas de campo perfeitamente desastrosas, enfim, por todos os momentos vividos nesta caminhada dos últimos anos. Em especial ao Felipe (o meu Fê!), meu irmão caçula, pela sua amizade única e incondicional, e ao Hugo, por todo carinho, amor e companheirismo (mesmo quando eu estava na França e você no Pantanal). Amo vocês!

Aux copains de la France, Agnese, Amandine, Augustin, Caro, Carmen, Chacha, Doudou, Fabi Grand, Fabi Petit et Phia, Manu I et Manu II. Merci pour l'amitié, les soirées, les barbecues sur la pelouse et tous les moments inoubliables qu'on a vécu ensemble. À mon copain, Loïc, pour me surveiller pendant l'escalade, pour ma première Délirium et pour les moments uniques ensemble. Je vous aime. Et, c'est sûr, j'irai revoir ma Normandie!

Agradeço especialmente à minha família. À minha mãe e ao meu pai, pelo carinho, amor, paciência e apoio em todos os momentos e decisões da minha vida. Obrigada por toda dedicação, por passarem tantas madrugadas acordados por nossa causa, desde quando tinham que trocar fraldas, até quando iam ver se a filha que estava escrevendo TCC não estava com frio... Vocês são únicos, e não tenham dúvida de que eu

agradeço todos os dias por tê-los na minha vida. Espero um dia conseguir ser para vocês motivo de orgulho tanto quanto vocês são para mim. À minha irmã, Nanda, minha “mãe II”, por sempre cuidar de mim e por todo carinho e alegria que você traz para a minha vida. Ao meu irmão, por todo amor e alegria, e, principalmente, por ter me apresentado à Biologia e mostrado o quão apaixonante ela é. Eu certamente não estaria aqui se não fosse por você. À minha cunhada, Mel, pelo carinho, amizade e apoio nas minhas aventuras. Amo todos vocês.

Aos técnicos do laboratório de citometria de fluxo, Bibiana e Denis, pela disposição e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, MCT/INFRA, CNPq-PRONEX, CAPES, FAPESC e INNT, pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. O folículo piloso.....	18
1.1.1. Origem embrionária do folículo piloso.....	20
1.1.2. Capacidade de autorrenovação e de regeneração da epiderme.....	21
1.2. A população de células-tronco do folículo piloso.....	23
1.2.1. Multipotencialidade para formar fenótipos epidermais.....	24
1.2.2. Pluripotencialidade para formar fenótipos da crista neural....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos gerais.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
3.2.1. Obtenção de células-tronco a partir de cultura de explante de folículos pilosos de vibrissa de camundongos.....	29
3.2.2. Obtenção de células-tronco a partir de folículos pilosos	

da região dorsal.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Animais.....	31
4.2. Obtenção de células-tronco de folículos pilosos.....	31
4.2.1. Obtenção de células-tronco a partir da migração de explante de folículos pilosos de vibrissas.....	31
4.2.2. Diferenciação das células derivadas de folículos pilosos de vibrissa em queratinócitos.....	32
4.2.3. Obtenção de células-tronco a partir de folículos pilosos da região dorsal.....	33
4.3. Análise de expressão gênica por RT-PCR.....	34
4.4. Análise da expressão protéica por imunocitoquímica de fluorescência.....	36
4.5. Análise da expressão protéica por citometria de fluxo.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Caracterização fenotípica das células obtidas a partir de cultura de explante de vibrissas de camundongo.....	39
5.2. Os meios de cultura CnT-02 e CnT-07 levam a mudanças morfológicas e na expressão de marcadores nas culturas de explante de vibrissas de camundongo.....	45
5.3. Caracterização da população celular obtida a partir de folículos pilosos da região dorsal de camundongo.....	52

6. DISCUSSÃO.....	54
6.1. Duas populações de células-tronco são obtidas através de cultura de explante de vibrissas de camundongo.....	54
6.1.1. Obtenção de células semelhantes à crista neural.....	54
6.1.2. Obtenção de precursores epidermais.....	55
6.1.3. Efeitos dos meios CnT-02 e CnT-07 nas culturas de explante de folículos pilosos de vibrissas de camundongos.....	57
6.2. Obtenção de células-tronco epidermais e semelhantes à cristan neural a partir de folículos pilosos da região dorsal de camundongo.....	60
6.3. Análise comparativa entre as metodologias utilizadas com vista para uma futura aplicação em terapias celulares de regeneração.....	61
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Perfil do folículo piloso.....	19
Tabela 01. Período de manutenção das culturas em cada tipo de meio.....	33
Figura 02. Etapas do desenvolvimento folicular.....	21
Tabela 02. Relação das sequências iniciadoras utilizadas na análise por RT-PCR.....	35
Figura 03. O ciclo de autorrenovação capilar.....	22
Tabela 03. Relação dos anticorpos primários utilizados na análise por imunocitoquímica.....	36
Figura 04. Cultura de folículos pilosos de vibrissas de camundongo com 3, 7, 11 e 14 dias.....	40
Tabela 04. Relação dos anticorpos secundários utilizados na análise por imunocitoquímica.....	37
Figura 05. Análise morfológica das células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura.....	41
Tabela 05. Relação dos anticorpos primários utilizados na análise por citometria de fluxo.....	38
Figura 06. Análise de expressão gênica por RT-PCR nas células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura.....	42
Tabela 06. Relação dos anticorpos secundários utilizados na análise por citometria de fluxo.....	38

Figura 07. Análise da expressão de p75 e β -Tubulina III por imunocitoquímica nas células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura.....	43
Figura 08. Análise da expressão de Krt-14 e β -Tubulina III nas células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura.....	44
Figura 09. Análise morfológica das células tratadas com meios CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura.....	46
Figura 10. Análise da expressão gênica por RT-PCR nas células tratadas com meio complexo, CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura.....	47
Figura 11. Análise da expressão de Krt-14 por imunocitoquímica nas células tratadas com meios CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura.....	49
Figura 12. Análise da expressão de Krt-15 e Krt-14 nas células tratadas com CnT-07, aos 14 dias de cultura.....	50
Figura 13. Análise de expressão de p75 e β -Tubulina III nas células tratadas com CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura.....	51
Figura 14. Análise de expressão gênica e protéica da população celular obtida a partir de folículos pilosos da região dorsal.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM: α -modified minimum essential

BMP: proteína morfogenética do osso

BRE: bainha radicular externa

BRI: bainha radicular interna

Bu: Bulge

CD: *cluster of differentiation*

CN: crista neural

CO₂: dióxido de carbono

CT: célula-tronco

DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxinucleotídeos tri-fostafados

dT: desoxitimidina

E: Embrião; E14.5: Embrião com 14.5 dias de desenvolvimento

EE: extrato de embrião

EGF: fator de crescimento epidermal

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IgG: imunoglobulina

Krt: citoqueratina

MgCl₂: cloreto de magnésio

PCR: reação de polimerização em cadeia

pH: potencial Hidrogeniônico

PD: papila dérmica

RNA: ácido ribonucléico

RT: reação de transcriptase reversa

SBF: soro fetal bovino

Sox: Sry-related HGM Box

TA: temperatura de anelamento

T3: triiodo-L-tironina

TC: tecido conjuntivo

RESUMO

O folículo piloso é um anexo epidérmico, cujo desenvolvimento tem início no período embrionário. Ao longo da vida do organismo, o folículo passa por sucessivos ciclos de degeneração e regeneração, os quais se devem à presença de um reservatório de células-tronco (CTs). No folículo piloso, existem duas populações principais de CTs: uma população multipotente, com capacidade de formar fenótipos epidermais, cujos principais marcadores são a citoqueratina 15 (Krt-15) e o CD34; e uma população pluripotente formada por células derivadas da crista neural (CN) e com capacidade de dar origem aos diferentes fenótipos derivados desta estrutura, como neurônios, melanócitos e células mesenquimais. Assim, o folículo piloso mostra-se como uma potencial fonte de CTs encontrada em tecidos adultos para uso em futuras terapias. O objetivo deste trabalho foi, portanto, analisar dois protocolos diferentes para obtenção de CTs do folículo piloso, caracterizar as populações celulares obtidas e avaliar sua capacidade de diferenciação em fenótipos epidermais. No primeiro protocolo (1), os folículos foram isolados de vibrissas de camundongos, dissecados para exposição do bulge, plaqueados e mantidos em cultura por 14 dias. No segundo (2), a pele da região dorsal de camundongo foi coletada e a epiderme (juntamente com os folículos pilosos) isolada e dissociada com o auxílio de enzimas (dispase e tripsina). Na cultura obtida pelo protocolo 1, também foram testados tratamentos com dois meios comerciais, CnT-02 e CnT-07, desenvolvidos para diferenciação e proliferação de queratinócitos, bem como para seu isolamento, respectivamente. Após a cultura, as células foram analisadas por ensaios de RT-PCR, imunocitoquímica (protocolo 1) e citometria de fluxo (protocolo 2). Foi observado que as células obtidas pelo protocolo 1 não expressam CD34, nem Krt-15, mas expressam Krt-19 e Krt-14, marcadores de CTs epidermais encontradas no bulge e de queratinócitos indiferenciados, respectivamente. Após o tratamento com os meios CnT-02 e CnT-07, as células positivas para Krt-14 adquiriram morfologia semelhante à de queratinócitos diferenciados. Além disso, foram obtidas células que expressam marcadores da CN, como p75, as quais, após tratamento com os meios CnT-02 e CnT-07, adquiriram morfologia neuronal, um fenótipo que é originado pela CN. Pelo protocolo 2, foram obtidas células que expressam Krt-15 e CD34,

marcadores de CTs do bulge. Além disso, foram encontradas células positivas para p75, demonstrando que também foram obtidas células semelhantes às da CN. Destaca-se o fato de que foram encontradas células que co-expressam estes dois marcadores. Assim, os resultados indicam que os protocolos foram eficientes para isolar tanto células com potencialidade para formar fenótipos epidermais, quanto células semelhantes à CN. Contudo, em uma perspectiva de aplicação em futuras terapias de regeneração, acreditamos que o protocolo 2 foi mais eficiente, tendo em vista os tipos celulares obtidos e a facilidade de realização dos procedimentos.

Palavras-chave: Folículo piloso, células-tronco, queratinócitos, crista neural

1. INTRODUÇÃO

1.1. O folículo piloso

A epiderme é a camada mais externa da pele e sua principal função é proteger o organismo contra alguns dos principais estresses ambientais, como a dessecação e a infecção por microorganismos. Ela é composta por um epitélio pluriestratificado formado majoritariamente por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. Além disso, é nesta camada que ocorre a formação de anexos, como glândulas, unhas e pelos (Fuchs e Nowak, 2008; Blanpain e Fuchs, 2009).

Os pelos constituem uma característica exclusiva de mamíferos e possuem diferentes funções, como termorregulação, proteção contra a radiação solar, camuflagem, dispersão de suor e gordura, funções táteis e sensoriais, além de desempenhar um importante papel nas interações sociais (Blanpain e Fuchs, 2009; Schneider *et al.*, 2009). Estas diversas funções podem ser desempenhadas por diferentes tipos de pelos. Em camundongos, por exemplo, existem quatro tipos de pelos de cobertura, além de estruturas ainda mais especializadas, como as vibrissas, as quais possuem um importante papel sensorial. Essa variedade de estruturas reflete uma diversidade de características e também diferentes sensibilidades a indutores (Sundberg e King, 1996; Schmidt-Ullrich e Paus, 2005; Wong *et al.*, 2006).

Os pelos são formados pelo folículo piloso, um anexo epidérmico cujo desenvolvimento tem início no período embrionário. Ele é formado por círculos concêntricos compostos por duas estruturas principais: a bainha radicular externa, que está em contato direto com a membrana basal da epiderme, e a bainha radicular interna, que forma um canal onde se encontra o eixo capilar (Figura 01 A) (Fuchs e Segre, 2000; Blanpain *et al.*, 2004, Schneider *et al.*, 2009).

O eixo capilar é formado por um conjunto de queratinócitos diferenciados (tricócitos), mortos e compactados, em uma estrutura organizada em três camadas de células: a medula, o córtex e a cutícula. A bainha radicular interna também é composta por três camadas de

células, contendo queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. A bainha radicular externa, por sua vez, é composta por células que formam uma camada contígua à epiderme interfolicular (Figura 01 B) (Fuchs, 2008; Fuchs e Nowak, 2008; Schneider *et al.*, 2009). Na bainha radicular externa, existe uma região protuberante chamada de bulge, a qual foi descrita pela primeira vez em 1876, por Unna (Hsu *et al.*, 2011), e que possui um reservatório de células-tronco (CTs) (Figura 01 A) (Fuchs e Nowak, 2008).

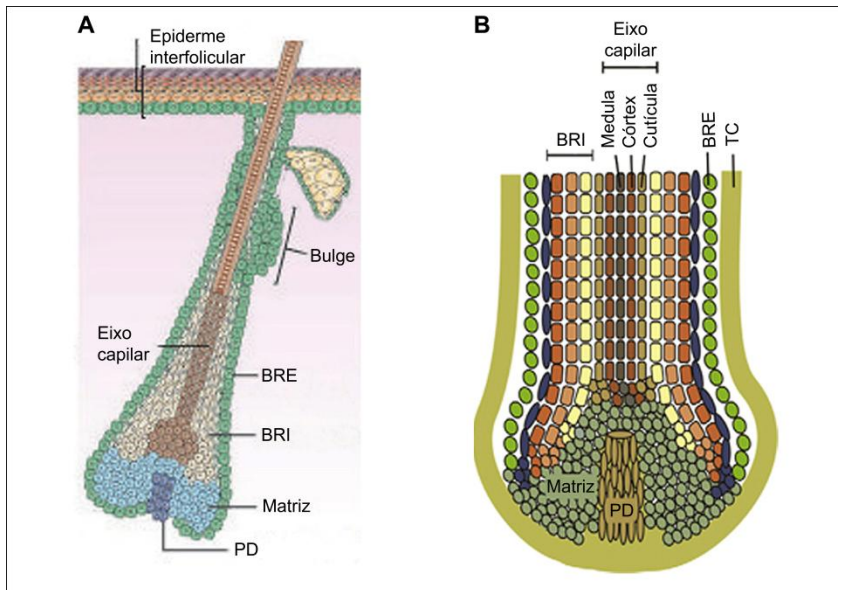


Figura 01. Perfil do folículo piloso. Os esquemas mostram as diferentes camadas que formam o folículo piloso. (A) O eixo capilar é envolvido pela bainha radicular interna (BRI) e pela bainha radicular externa (BRE). Na BRE, encontra-se uma região protuberante chamada de bulge, a qual possui um reservatório de CTs (adaptado de Blanpain e Fuchs, 2009). (B) O eixo capilar é composto por três camadas: a medula, o córtex e a cutícula. A bainha radicular interna, por sua vez, é formada por camadas concêntricas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. Ao redor da bainha radicular externa, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo (TC), a qual envolve a estrutura do folículo como um todo. (PD): Papila dérmica (adaptado de Schneider *et al.*, 2009)

1.1.1. Origem embrionária do folículo piloso

Apesar da variedade de formas e características que podem apresentar, os folículos pilosos de um organismo ou mesmo de diferentes espécies possuem, de maneira geral, um processo de desenvolvimento morfológico semelhante (Paus *et al.*, 1999). Em camundongos, o processo de formação folicular tem início por volta do 14º dia de desenvolvimento embrionário (E14.5). Neste período (Figura 02 A), interações epitélio-mesenquimais resultam na formação de pequenas invaginações epidermais na derme, chamadas de placóides, sob os quais se formam agregados de células dermais (Figura 02 B). Uma vez formados, os placóides tornam-se altamente proliferativos e as células epidermais passam a penetrar cada vez mais fundo na derme, dando origem ao germe folicular (Figura 02 C). As células epidermais mais proliferativas alcançam, então, os agregados dermais e começam a envolvê-los. Estas células vão formar a matriz epitelial e os agregados dermais constituirão a papila dérmica. Nesta mesma etapa, as células epiteliais foliculares entram em um processo de diferenciação e formam a estrutura tubular da bainha radicular interna, ao redor da qual se mantém uma camada de células em contato com a lâmina basal - a bainha radicular externa (Figura 02 D) (Schmidt-Ullrich e Paus, 2005; Fuchs, 2008; Fuchs e Nowak, 2008). Além das estruturas formadas pela ectoderme e pela mesoderme, o folículo piloso também é composto por precursores de melanócitos derivados da crista neural (CN), que darão origem à unidade de pigmentação (Peters *et al.*, 2002; Sieber-Blum *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2009).

Este processo de desenvolvimento não ocorre ao mesmo tempo para todos os folículos pilosos. Em camundongos, ocorrem quatro ondas de desenvolvimento, sendo que os primeiros folículos começam a se formar no dia E14.5, e os últimos nos primeiros dias após o nascimento. Em geral, os diferentes tipos de pelos de um organismo iniciam seu processo de desenvolvimento em momentos distintos. Após esse período os folículos passam por sucessivos ciclos de degeneração e regeneração que serão descritos a seguir (Fuchs, 2008).

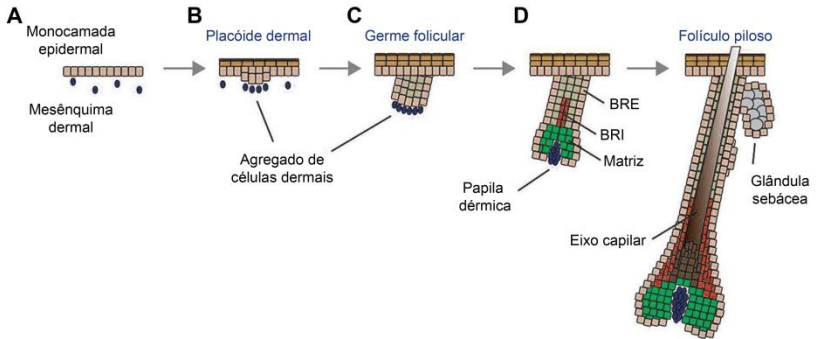


Figura 02. Etapas do desenvolvimento folicular. A partir de interações epitélio-mesenquimais (A), formam-se os chamados placóides, os quais consistem em invaginações epidermais sob as quais formam-se agregados dermais (B). As células epidermais passam a proliferar (C) e envolvem estes agregados, os quais dão origem à papila dérmica. As células mais proliferativas dão origem à matriz, enquanto as células epiteliais da região superior formam a bainha radicular interna (BRI) e externa (BRE) (D) (adaptado de Fuchs e Nowak, 2008).

1.1.2. Capacidade de autorrenovação e de regeneração da epiderme

A epiderme e seus anexos, como o folículo piloso, são frequentemente lesionados por agentes diversos, como a radiação solar ou o simples atrito. Este desgaste pode comprometer a função protetora destas estruturas, que precisam passar por um constante processo de regeneração, a fim de reparar danos, substituir células senescentes e manter sua integridade física (Fuchs, 2007).

No folículo piloso, este processo de renovação é dividido em três etapas principais: catágena, telógena e anágena. Quando as células da matriz epitelial entram em apoptose, o crescimento capilar cessa, sendo esta fase conhecida como catágena. Neste processo, o folículo piloso regride e a papila dérmica desloca-se até a base da região permanente do folículo, onde ficam as CTs do bulge. Em seguida, o folículo piloso entra em uma fase de repouso (telógena), até que uma onda de sinalizações leva as células da região basal do folículo a proliferar e regenerar o pelo (anágena), que se desenvolve ao lado do antigo. Isso

exige uma reorganização das células proliferativas, o que forma a estrutura saliente característica do bulge. O período telogênico é variável entre cada folículo, o que faz com que, com o tempo, eles passem a iniciar seus ciclos em momentos diferentes (Blanpain *et al.*, 2004; Greco *et al.*, 2009) (Figura 03).

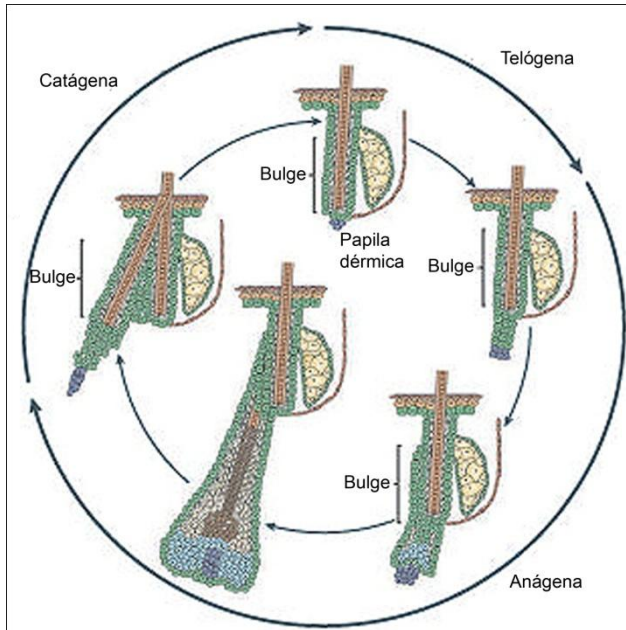


Figura 03. O ciclo de autorrenovação capilar. O esquema mostra as diferentes etapas que compõem o ciclo capilar: anágena, telógena e catágena (adaptado de Blanpain e Fuchs, 2009).

Além de se autorrenovar, as células do folículo piloso também possuem a capacidade de proliferar e regenerar a epiderme após a ocorrência de uma lesão. A epiderme possui um processo próprio de renovação, o qual se baseia na proliferação de células da camada basal. Estas células proliferam e entram em um programa de diferenciação terminal, movendo-se para camadas mais externas da epiderme. Uma das principais características desta diferenciação é a mudança na expressão de citoqueratinas. Após darem início ao processo de

diferenciação e passam para a camada adjacente (espinhosa), as células da camada basal, que se caracterizam por uma alta expressão de citoqueratinas 5 e 14 (Krt-5 e Krt-14), passam a expressar majoritariamente as citoqueratinas 1 e 10 (Krt-1 e Krt-10) (Fuchs e Nowak, 2008). Mas, além das células da camada basal, a população celular encontrada no folículo piloso também participa deste processo de renovação. Ensaios *in vivo* demonstram que estas células possuem a capacidade de migrar e regenerar um epitélio completo – epiderme, folículos pilosos e glândulas sebáceas (Morris *et al.*, 2004). Além disso, experimentos posteriores com modelos de lesão em camundongos mostram que, uma semana após a ocorrência do trauma, o local do ferimento encontra-se coberto por queratinócitos tanto de origem epidermal, quanto folicular (Levy *et al.*, 2007). Esta capacidade de autorrenovação folicular e seu potencial para regenerar a epiderme foram alguns dos indícios que levaram à descoberta da existência de CTs no folículo piloso (Larouche *et al.*, 2008).

1.2. A população de células-tronco do folículo piloso

As CTs caracterizam-se por possuírem a capacidade de se autorrenovar e também de originar um ou mais tipos celulares diferenciados. Elas podem ser classificadas segundo seu potencial de diferenciação em: totipotentes, as quais possuem a capacidade de formar todos os tipos de tecidos embrionários e extra-embrionários; pluripotentes, que podem formar todos os tipos celulares embrionários; multipotentes, as quais dão origem a um determinado grupo de linhagens celulares; oligopotentes, com capacidade de formar uma gama mais restrita de linhagens celulares; e unipotentes, as quais formam apenas um tipo de células maduras (Wagers e Weissman, 2004). Nos últimos anos, diversos trabalhos mostraram a existência de CTs em tecidos adultos, como é o caso das encontradas no folículo piloso. (Fuchs e Segre, 2000). No organismo, elas constituem verdadeiros reservatórios com potencialidade para formar diferentes tipos celulares e, por isso, têm sido estudadas como uma potencial fonte de material para uso futuro em terapias de regeneração. Uma das principais vantagens do uso destas células é a possibilidade de realização de transplantes autólogos, evitando o risco de rejeição (Slack, 2001). Assim, estudar a origem, as características e as propriedades das CTs

foliculares é um passo essencial para compreendermos seu potencial (Larouche *et al.*, 2008).

Já se sabe que no folículo piloso são encontrados dois grupos principais de CTs: uma população multipotente com características epiteliais, capaz de formar todos os fenótipos encontrados na epiderme; e outra população pluripotente, que expressa marcadores da CN e é capaz de formar diferentes fenótipos originados por esta estrutura (Wong *et al.*, 2006).

1.2.1. Multipotencialidade para formar fenótipos epidermais

Vamos primeiramente tratar das células com potencialidade epitelial. No folículo piloso, essas células encontram-se na região do bulge e estão, na maior parte do tempo, em um estado de quiescência. Células isoladas desta estrutura possuem alto potencial de proliferação *in vitro*. Ensaios feitos para analisar a capacidade de células oriundas de diferentes regiões do folículo piloso (de vibrissas de camundongos) para formação de colônias mostraram que cerca de 95% das colônias obtidas vieram da região onde se encontra o bulge (Kobayashi *et al.*, 1993).

Dois dos principais marcadores positivos das células do bulge são a Krt-15 (Liu *et al.*, 2003) e o CD34 (Trempus *et al.*, 2003). No folículo piloso de camundongos, o CD34 é expresso exclusivamente nesta região. Estudos *in vitro* demonstram que células foliculares que expressam esse marcador possuem a capacidade de se autorrenovar e também de formar diferentes tipos celulares (multipotencialidade), ou seja, que possuem características de CTs. Através da aplicação de células de folículo piloso com alta expressão de CD34 em camundongos mutantes para o gene FoxN1 (que não desenvolvem pelos) em regiões cuja pele foi cirurgicamente removida, demonstrou-se a capacidade desta população celular de regenerar epiderme e folículos pilosos (Blanpain *et al.*, 2004). Em trabalho publicado em 2008, Larouche e colaboradores obtiveram a regeneração *in vitro* de um epitélio interfolicular completo a partir da implantação da região do bulge (obtido a partir de vibrissas) em matrizes de regeneração dérmica (Larouche *et al.*, 2008). Além disso, por microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que células foliculares com alta expressão de

CD34 apresentam características típicas de progenitores, como núcleo grande, nucléolo evidente e poucas organelas citoplasmáticas (Huang *et al.*, 2009).

Mas é importante destacar que a região do bulge não é composta por uma população homogênea. Nela, encontramos um conjunto heterogêneo de células, dentre as quais é possível identificar duas populações de CTs epiteliais com alta capacidade de formação de colônias e que podem ser distinguidas por suas características morfológicas e seu perfil de expressão de citoqueratinas. Uma delas localiza-se na camada basal mais externa e expressa as citoqueratinas 5, 15, 17 e 19, as quais se encontram em uma rede pouco organizada. Adjacente a esta camada está outra população, a qual se caracteriza pela expressão de citoqueratinas 5 e 17. Ensaios de imunohistoquímica demonstraram que nenhuma destas populações expressa Krt-14, a qual é encontrada apenas em uma camada mais interna do folículo (Larouche *et al.*, 2008). É importante destacar que a Krt-19 também é considerada um marcador de CTs epidermais, sendo expressa em precursores de queratinócitos (Michel *et al.*, 1996).

1.2.2. Pluripotencialidade para formar fenótipos da crista neural

A CN é uma estrutura embrionária transitória exclusiva de embriões de craniatas. Ela se forma durante o processo de neurulação, quando a placa neural invagina-se para dar origem ao tubo neural. A região de transição entre o ectoderma neural e epitelial é chamada de CN. No momento do fechamento do tubo neural, as células da CN adquirem características mesenquimais e, em um momento determinado, deixam o primórdio neural e migram pelo embrião através de vias definidas, dando origem a diversos tipos celulares. Entre os fenótipos originados estão células gliais e neurônios do sistema nervoso periférico, melanócitos, células endócrinas e mesenquimais (como células ósseas, cartilagem e células de músculo liso) (Le Douarin *et al.*, 1993; Le Douarin e Kalcheim, 1999; Hall, 2009).

Em trabalho publicado em 2004, Sieber Blum e colaboradores demonstraram que Wnt-1, um marcador de células pré-migratórias e migratórias da CN, é expresso em células da derme facial e da papila

dermal de folículos pilosos. Este marcador também é encontrado nas camadas mais internas da bainha radicular externa de vibrissas de camundongos, sendo que uma grande população celular que expressa Wnt-1 encontra-se na região do bulge. Além disso, identificou-se este marcador em células que migram do bulge em direção à base do folículo, onde se dará origem a um novo pelo, o que sugere que esta população celular possui uma capacidade migratória dentro do folículo piloso, que pode estar relacionada ao ciclo de autorrenovação folicular (Sieber-Blum *et al.*, 2004).

Além disso, estudos *in vitro*, demonstram que células do folículo piloso que expressam Sox-10 (também marcador de células da CN que migram precocemente) possuem capacidade migratória. Através de ensaios de clonagem com estas células que migram a partir do folículo, demonstrou-se sua capacidade de autorrenovação e sua pluripotencialidade. Entre os clones, foram obtidos neurônios, células de músculo liso, células de Schwann (raras) e melanócitos, fenótipos que são formados pela CN. Observou-se também que, sob indução de BMP-2 (proteína morfogenética do osso tipo 2), estas células possuem a capacidade de se diferenciar em condrócitos e, sob a indução de neuregulina-1, em células de Schwann (Sieber-Blum *et al.*, 2004).

Outro marcador de células derivadas da CN encontrado em folículos pilosos de camundongos foi o p75, um receptor glicoprotéico transmembranar. Através de estudos de imunohistoquímica em amostras de pele de camundongos, observou-se a expressão deste marcador na bainha radicular externa (Botchkareva *et al.*, 1999), na região do bulge, em terminações nervosas, na glândula sebácea e na região bulbar, onde se encontram os precursores de melanócitos (Wong *et al.*, 2006). Contudo, é importante destacar que também foi observada a expressão de p75 em células não derivadas da CN, o que indica que esta molécula não é um marcador exclusivo de células derivadas desta estrutura. No que se refere à potencialidade, Wong e colaboradores demonstraram que células p75 positivas isoladas da pele da região truncal de camundongos e cultivadas sob a forma de esferas possuem capacidade de autorrenovação e de formar diferentes fenótipos da CN: células de glia, músculo liso, neurônios, condrócitos (através de tratamento com ácido ascórbico e BMP-2), melanócitos (através de tratamento com fator de

CT e endotelina-3) e adipócitos (Wong *et al.*, 2006). Esta capacidade de formar fenótipos tão diversificados reforça a possibilidade de uso destas CTs encontradas no folículo piloso em futuras terapias celulares.

2. JUSTIFICATIVA

A procura por CTs em organismos adultos é uma das grandes apostas da ciência atual na busca por tratamentos para diferentes doenças e lesões sofridas pelo ser humano e outros animais. Uma das principais vantagens do uso destas células é o fato de possibilitarem transplantes autólogos, evitando problemas de rejeição do tecido. As CTs de folículo piloso, por sua capacidade de proliferação e diferenciação, configuram-se em uma potencial fonte deste material. Além disso, o folículo piloso possui vantagem de ser uma estrutura de fácil acesso, que apresenta um processo de isolamento relativamente simples. Uma das possibilidades de uso destas células seria para auxiliar o processo de regeneração da pele após uma lesão. Contudo, é preciso, primeiramente, conhecer melhor a população celular do folículo piloso como um todo, suas características e potencialidades, além de aprimorar técnicas para obtê-las. Como em nosso laboratório, está em desenvolvimento o projeto de pesquisa “Avaliação do potencial terapêutico e biotecnológico de células-tronco isoladas de folículo piloso humano”, que estuda a regeneração tecidual para futura aplicação em pacientes que sofreram queimadura em grande área, será dado um enfoque maior para obtenção de precursores epidermais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar e aperfeiçoar diferentes técnicas para obtenção e cultivo de CTs de folículos pilosos de camundongos e caracterizar as populações celulares obtidas quanto à expressão de marcadores e à capacidade de diferenciação em fenótipos epidermais.

3.2. Objetivos específicos

- Aperfeiçoar e analisar comparativamente duas metodologias disponíveis na literatura para obtenção de CTs de folículos pilosos de camundongos (*Mus musculus*) e caracterizar as populações celulares obtidas em cada uma delas;

3.2.1. Obtenção de células-tronco a partir de cultura de explante de folículos pilosos de vibrissa de camundongos

- Analisar as características morfológicas das células obtidas a partir de cultura de explante de folículos pilosos de vibrissas de camundongos;

- Analisar, por RT-PCR, a expressão gênica de marcadores de CTs do bulge (Krt-15 e Krt-19), de queratinócitos indiferenciados da camada basal epidérmica (Krt-14), de células da CN migratória (Slug), de precursores de melanócitos (Pax-3) e de precursores neurais (também Pax-3 e Nestina);

- Analisar, por imunocitoquímica de fluorescência, a expressão protéica de marcadores de CTs do bulge (CD34 e Krt-15), de queratinócitos indiferenciados da camada basal epidérmica (Krt-14), da CN embrionária indiferenciada (p75) e de precursores neurais (β -Tubulina III);

- Avaliar o potencial de diferenciação *in vitro* da população celular obtida a partir de cultura de folículos pilosos de vibrissas de

camundongo em queratinócitos, mediante o tratamento com meios de isolamento e diferenciação (CnT-02) e de isolamento e crescimento de queratinócitos (CnT-07). A avaliação foi realizada com base em análise morfológica, de expressão gênica (por RT-PCR) e protéica (por imunocitoquímica de fluorescência), sendo que foram analisados os mesmos marcadores descritos nos dois itens anteriores;

3.2.2. Obtenção de células-tronco a partir de folículos pilosos da região dorsal

- Analisar por citometria de fluxo a expressão protéica de marcadores de CTs do bulge (CD34) e de células da CN embrionária indiferenciada (p75);

- Analisar a expressão gênica da população celular obtida por RT-PCR. Foram analisados os mesmos marcadores usados para avaliação das células obtidas por cultura de explante.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, linhagem B57B1) com 6 a 9 semanas de idade. Os animais foram obtidos de criação própria em nosso biotério, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

A utilização destes camundongos 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 11 de maio de 2009, sob o protocolo de pesquisa/ensino número 323/CEUA/UFSC.

4.2. Obtenção de células-tronco de folículos pilosos

Foram testados e aperfeiçoados dois protocolos disponíveis na literatura para obtenção de CTs de folículos pilosos de camundongos. O material obtido pelas diferentes metodologias foi analisado a fim de caracterizar as populações celulares obtidas e avaliar sua potencialidade.

4.2.1. Obtenção de células-tronco a partir da migração de explante de folículos pilosos de vibrissas

Os animais com idade de 6 a 8 semanas foram sacrificados por deslocamento cervical e a região da pele contendo as vibrissas foi coletada e armazenada em solução salina tamponada por fosfato (PBS) (pH 7,4) para posterior isolamento dos folículos pilosos. A partir deste procedimento, toda manipulação foi feita em capela de fluxo laminar. Os folículos foram extraídos e dissecados sob microscópio estereoscópico (Olympus CK40) com a ajuda de pinças e agulhas entomológicas de tungstênio para remoção da cápsula que o envolve, deixando exposta a região do bulge.

Em seguida, os folículos pilosos foram cultivados em placas previamente revestidas com colágeno tipo I (Sigma), contendo meio complexo. Este era composto de meio *α-modified minimum essential* (*α*-MEM, Invitrogen), contendo 15% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (20 U/mL, Gibco), estreptomicina (10 µg/mL, Gibco), hidrocortisona (0,1 µg/mL, Sigma), transferrina (10 µg/mL, Sigma), insulina (1 ng/mL, Sigma), 3-3'-5 triiodo-L-tironina (T3) (0,4 ng/mL, Sigma), glucagon (0,01 ng/mL, Sigma), fator de crescimento epidermal (EGF) (0,1 ng/mL, Sigma) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) (1 ng/mL, Sigma) (Costa-Silva *et al.*, 2009). Para análise por imunocitoquímica, foram usadas placas de 24 poços (Corning), contendo 150 µL de meio complexo, sendo que foi colocado um folículo por poço. Para análise por RT-PCR foram usadas placas de 35 mm (Corning), contendo 500 µL de meio complexo, sendo que foram colocados, em média, 8 folículos por placa.

A fim de facilitar a adesão dos folículos na placa de cultura, após o plaqueamento, foi retirado aproximadamente 75% do meio de cada placa e o material foi incubado em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ atmosférico durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, foi acrescentado 500 µL e 1,5 mL do meio complexo descrito anteriormente nas placas de 24 poços e de 35 mm, respectivamente, e a cultura foi novamente incubada em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂ atmosférico (adaptado de Sieber-Blum e Grim, 2004).

4.2.2. Diferenciação das células derivadas de folículos pilosos de vibrissa em queratinócitos

Foram testados dois meios de cultura comerciais a fim de induzir a proliferação e diferenciação de queratinócitos nas culturas obtidas: CnT-02 (Epidermal Keratinocyte Medium) e CnT-07 (PCT Epidermal Keratinocyte Medium) (ambos Millipore). A concentração de cálcio é um dos diferenciais desses meios. Segundo informações do fabricante, o CnT-02 é indicado para isolamento e diferenciação de queratinócitos de camundongos. Já o CnT-07 foi desenvolvido para isolamento e crescimento de queratinócitos, porém, sua fórmula causa atraso na diferenciação terminal das células.

Para o presente estudo, as células foram mantidas em cultura em meio complexo durante 10 dias. Após este período, duas amostras tiveram os meios trocados por CnT-02 e CnT-07, enquanto uma terceira foi mantida com meio complexo para controle. A cultura foi mantida nestas novas condições durante mais 4 dias (Tabela 1).

Tabela 01. Período de manutenção das culturas em cada tipo de meio.

Amostra	10 dias	
	← 0 a 10 dias	10 a 14 dias →
1	Meio complexo*	Meio complexo*
2	Meio complexo*	Cnt-02
3	Meio complexo*	Cnt-07

* Meio Complexo: contendo meio α -modified minimum essential (α -MEM, Invitrogen), 15% de soro fetal bovino (SBF) (Cultlab), 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (20 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 μ g/mL, Gibco), hidrocortisona (0,1 μ g/mL, Sigma), transferrina (10 μ g/mL, Sigma), insulina (1 ng/mL, Sigma), 3-3'-5 triiodo-L-tironina (T3) (0,4 ng/mL, Sigma), glucagon (0,01 ng/mL, Sigma), fator de crescimento epidermal (EGF) (0,1 ng/mL, Sigma) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) (1 ng/mL, Sigma)

Após este período, foi realizada análise morfológica e análise fenotípica por imunocitoquímica de fluorescência e de expressão gênica por RT-PCR.

4.2.3. Obtenção de células-tronco a partir de folículos pilosos da região dorsal

Os animais foram sacrificados com idade de 7 a 9 semanas por deslocamento cervical. Os pelos da região dorsal foram raspados com lâmina de barbear e a área foi desinfetada com álcool 70%. A pele foi, então, removida com o auxílio de tesouras e pinças e colocada em placa de Petri com PBS contendo penicilina (20 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 μ g/mL, Gibco). A partir desta etapa, toda manipulação foi feita em capela de fluxo laminar. A dissociação enzimática do material coletado foi realizada através de solução contendo dispase (12,5 U/mL, Sigma) ou tripsina (0,25%, Sigma), com

diferentes períodos de incubação e temperatura, a fim de avaliar qual a melhor condição para realizar este procedimento.

Em seguida, sob microscópio estereoscópico (Olympus CK40), a epiderme (juntamente com os folículos pilosos) foi removida com o auxílio de pinças e submetida à dissociação para a obtenção das células. Para isso, o material coletado (epiderme e folículos pilosos) foi incubado com tripsina (0,25%) por 45 minutos a 37°C. Após este período, o material foi dissociado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, foi acrescentado SBF diluído em PBS (1:4) para bloquear a reação enzimática e o material foi centrifugado a 190 G por 10 minutos a 4°C (adaptado de Lorz *et al.*, 2010).

A eficiência do protocolo foi testada analisando-se a presença e a proporção de células CD34 positivas (por citometria de fluxo). Além disso, também foi analisado o padrão de expressão gênica do material obtido através de RT-PCR.

4.3. Análise de expressão gênica por RT-PCR

A análise de expressão gênica por RT-PCR foi realizada nas amostras obtidas através dos três protocolos descritos anteriormente. No caso das células mantidas em cultura (4.2.1 e 4.2.2), o material foi lavado com PBS, os folículos pilosos foram retirados e foram coletadas apenas as populações celulares que migraram/proliferaram para a placa de cultura a partir dos explantes. No caso do material coletado da região dorsal (4.2.3), foi analisado todo o *pool* celular obtido. Após a obtenção das células, o RNA foi extraído com TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), conforme especificações do fabricante.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de reação com Transcriptase Reversa. Para isso, foi feita uma solução inicial contendo: de 0,3 µg a 1 µg de RNA e iniciador oligo dT (Promega, 0,5 mg/mL), a qual foi incubada por 5 minutos a 70°C e, depois, resfriada a 4°C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados nucleotídeos (dNTP, Promega, 0,5 mM), cloreto de magnésio (MgCl₂) (Promega, 50 mM), Tampão 5 X (Promega), 1 µL de Transcriptase Reversa

(Promega) e H₂O livre de DNase-RNase, de forma que a solução final tivesse um volume de 20 µL. Esta solução foi colocada em termociclador por 5 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C e 15 minutos a 70°C.

Em seguida, foi feita amplificação de cDNA, utilizando-se seqüências iniciadoras para marcadores de CTs do bulge, de queratinócitos indiferenciados da camada basal epidérmica, de células da CN migratória, de precursores de melanócitos e de precursores neurais (Tabela 02). Como controle interno da reação com Transcriptase Reversa foi utilizado primer para amplificação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é um gene altamente expresso, pois codifica uma enzima que participa da glicólise. O kit utilizado para esta reação foi o Master Mix (Promega), seguindo-se especificações do fabricante.

Tabela 02. Relação das seqüências iniciadoras utilizadas na análise por RT-PCR.

Genes	Marcador de	Seqüência iniciadora	TA**	Fonte
Nestina	precursor neural	5'-CAGGTGGTGTACTGTAGAC-3' 5'-CACTCTAGCTTTGATAACTTGAC-3'	54°C	IDT
Slug	CN migratória	5'-CTCACCTCGGGAGCATAACAGC-3' 5'-TGAAGTGTCAGAGGAAGGCGGG-3'	58,5°C	IDT
Pax-3	precursor neural e de melanócitos	5'-AGGAGGCGGATCTAGAAAGGAG-3' 5'-TGTGGAATAGACGTGGGCTGGTA-3'	59°C	IDT
Krt-15	CT do bulge	5'-GAGAGAAATCTAAGTGTCTGGTG-3' 5'-GATAACACCCTTTTAGAAGTGG-3'	52°C	IDT
Krt-19	CT do bulge	5'-CGGAAGGATGCTGAAGCCAC-3' 5'-CAGGGGAGTCTCGTGGTAG-3'	55°C	IDT
Krt-14	Queratinócito indif.	5'-AGATCCGCACCAAGGTCATGG-3' 5'-GTGCAACTCAGAAAAAGAAGC-3'	59°C	IDT
GAPDH	enzima da glicólise*	5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3' 5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3'	58°C	IDT

*Controle interno da reação

**TA: Temperatura de anelamento

A visualização das sequências amplificadas foi feita através de eletroforese em gel de agarose (2%) e coloração com Blue Green (Promega).

4.4. Análise da expressão protéica por imunocitoquímica de fluorescência

A análise por imunocitoquímica foi realizada com as células obtidas pelas metodologias descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2 (cultura de explante). Para isso, as células obtidas em cultura foram lavadas com PBS e depois fixadas com paraformaldeído a 4%. Após a retirada do paraformaldeído, foram novamente lavadas com PBS. No caso de epítomos localizados no meio intracelular, as células foram permeabilizadas através de incubação com PBS-Triton X-100, a 0,25%, por 20 minutos à temperatura ambiente. O material foi, então, incubado com SBF a 5% durante 1 hora para bloquear sítios inespecíficos.

O próximo passo foi a incubação com os anticorpos primários, que foi feita durante 12 horas a 4°C. Foram utilizados anticorpos para identificação de células do bulge, da CN, de queratinócitos indiferenciados da camada basal e de precursores neurais. Os marcadores utilizados para identificar cada fenótipo e suas especificações encontram-se descritos na tabela 03.

Tabela 03. Relação dos anticorpos primários utilizados na análise por imunocitoquímica.

Anticorpo primário	Marcador de	Produzido em	Imuno globulina	Diluição	Fonte
anti-p75	células da CN	coelho	IgG	1:200	Chemicon
Anti-β-Tubulina III	neurônios	camundongo	IgG1	1:600	Promega
anti-CD34	CTs do bulge	rato	IgG2a	1:50	Abcam
anti-Krt-15	CTs do bulge	camundongo	IgG2a	1:200	Abcam

Após a retirada do excesso do anticorpo, as células foram lavadas com PBS Tween 20 (Sigma) a 0,05%. O material foi, então, incubado com os anticorpos secundários (Tabela 04) por 1 hora a 37°C. A partir deste procedimento, as células foram mantidas protegidas da luz para evitar o desgaste da fluorescência.

As células foram novamente lavadas com PBS Tween 20 (Sigma) a 0,05% para retirada do anticorpo secundário não ligado (excesso). Em seguida, foram incubadas com o corante nuclear fluorescente com 4'6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido – DAPI (1:1000, Sigma). O material foi lavado com PBS Tween. Em seguida, foi mantido em PBS para análise ao microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71).

Tabela 04. Relação dos anticorpos secundários utilizados na análise por imunocitoquímica.

Anticorpo secundário	Reconhece	Fluoro cromo	Diluição	Fonte
Anti-IgG	camundongo	AlexaFluor 488	1:400	Invitrogen
Anti-IgG	rato	AlexaFluor 488	1:100	Invitrogen
Anti-IgG	coelho	AlexaFluor 594	1:240	Invitrogen
Anti-IgG	camundongo	AlexaFluor 488	1:400	Invitrogen

4.5. Análise da expressão protéica por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada com as células obtidas através da metodologia descrita no item 4.2.3 (digestão enzimática de folículos pilosos da região dorsal). Para isso, o *pool* celular obtido após a digestão enzimática foi primeiramente fixado com paraformaldeído a 4%. Em seguida, o material foi lavado com solução de SBF a 10%, centrifugado a 1200 rpm para remoção do excesso e incubado com anticorpo primário durante uma hora a 4°C. Foram utilizados anticorpos contra marcadores de CTs do bulge precursoras

epidermais e de CN. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se descritos na tabela 05.

Tabela 05. Relação dos anticorpos primários utilizados na análise por citometria de fluxo.

Anticorpo primário	Marcador de	Produzido em	Imuno globulina	Diluição	Fonte
anti-p75	células da CN	coelho	IgG	1:200	Chemicon
anti-CD34	CTs do bulge	rato	IgG2a	1:50	Abcam

Após a remoção do anticorpo primário não ligado, lavagem e centrifugação, a amostra foi incubada com anticorpo secundário. Os anticorpos utilizados, bem como suas especificações estão relacionados na tabela 06. O excesso de anticorpo foi removido e o material foi novamente lavado com solução de SBF. Após centrifugação e remoção do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 100 µL de solução de SBF e analisadas por citometria de fluxo através do sistema FACS Calibur (BD Bioscience). Os dados obtidos foram, então, analisados pelo *software* FlowJo.

Tabela 06. Relação dos anticorpos secundários utilizados na análise por citometria de fluxo.

Anticorpo secundário	Reconhece	Fluoro cromo	Diluição	Fonte
Anti-IgG	rato	AlexaFluor 488	1:100	Invitrogen
Anti-IgG	coelho	AlexaFluor 594	1:240	Invitrogen

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização fenotípica das células obtidas a partir de cultura de explante de vibrissas de camundongo

Após o plaqueamento das vibrissas em meio complexo, as culturas foram acompanhadas diariamente através de microscopia óptica. Desta forma, observou-se que, na maioria dos explantes, as células começam a migrar e proliferar a partir do folículo piloso entre o 3º e 5º dia de cultura. Contudo, em alguns explantes, esta migração/proliferação teve início mais tarde, como pode ser observado na figura 04. Esse processo de migração e expansão ocorre principalmente a partir das regiões do bulge e da papila dérmica. De maneira geral, as células que partem da região da papila dérmica começam a migrar e proliferar antes das originárias da região do bulge. Por volta do 8º dia, as células passam por um pico de proliferação e migração, contudo, por volta do 11º dia este processo passa a ocorrer a uma taxa bem mais baixa.

A população celular observada é bastante heterogênea, quanto à morfologia e à capacidade de migração e proliferação celular (Figura 04). É importante destacar que, em alguns folículos, observou-se claramente a presença de duas populações celulares distintas. Uma população com morfologia fibroblastóide, com células alongadas e de núcleo pequeno, localizada periféricamente na cultura (Figura 05, setas azuis), e outra com células de citoplasma mais compacto e quadrangular e núcleo grande, localizada próximo ao folículo (Figura 05, setas pretas).

Além das variações morfológicas, outra observação importante foram as alterações estruturais dos folículos pilosos durante o período de cultura. Estas mudanças também são heterogêneas entre os diferentes folículos. Em alguns casos, há uma dispersão das camadas de células que envolvem o eixo capilar. Mas, uma das observações mais interessantes foi a de que, em alguns explantes, há uma reorganização das células ao redor do eixo capilar, ocorrendo um entumescimento da região ao redor da papila (Figura 04 C, F, I, L, setas brancas).

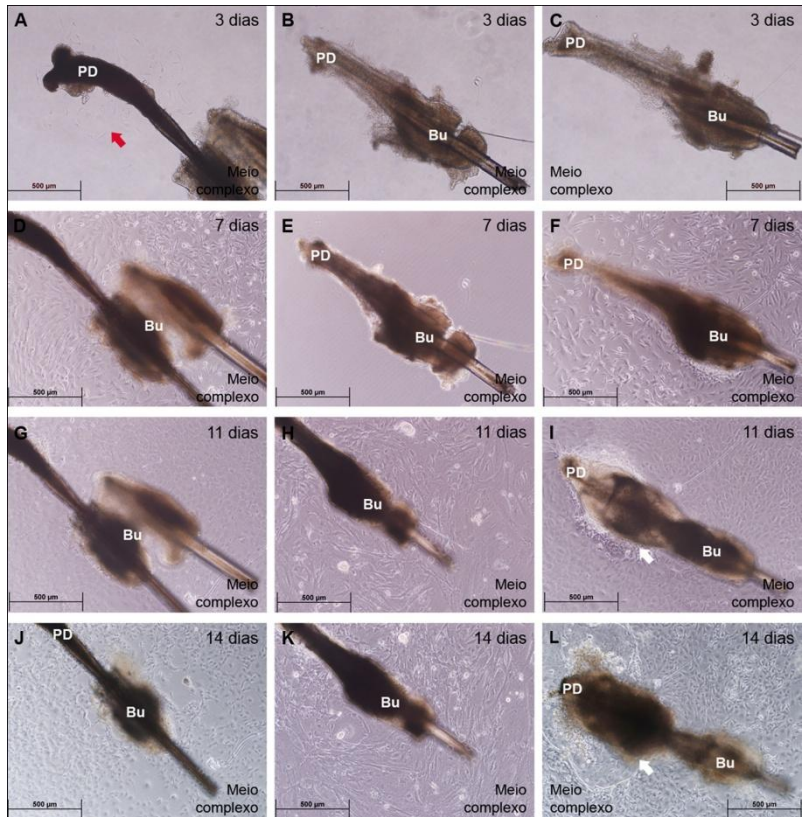


Figura 04. Cultura de folículos pilosos de vibrissas de camundongo com 3, 7, 11 e 14 dias. Análise morfológica das células tratadas com meio complexo com 3 (A-C), 7 (D-F), 11 (G-I) e 14 (J-L) dias de cultura, através de microscópio de contraste de fase. Observando-se o desenvolvimento de três amostras distintas, pode-se perceber a heterogeneidade da cultura tanto em relação à morfologia das células, quanto ao padrão de migração. Em alguns explantes, a migração tem início na região da papila dérmica (A, seta vermelha). Além disso, em alguns casos, observa-se uma mudança estrutural do folículo piloso (I, L, seta branca). (Bu): Bulge; (PD): Papila dérmica.

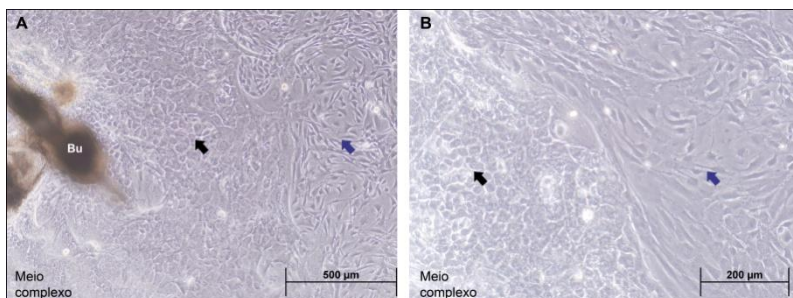


Figura 05. Morfologia das células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura. Observação das células ao microscópio de contraste de fase (A,B) após 14 dias de cultivo. Pode-se observar a presença de duas populações celulares distintas: uma composta por células com formato quadrangular (setas pretas), mais próximo ao explante, e outra com formato fibroblastóide, localizada periféricamente (setas azuis). (Bu): Bulge.

A análise por RT-PCR (n=3) revelou que as células cultivadas em meio complexo eram positivas para Slug e para Pax-3, marcadores de células da CN, sendo que Pax-3 está relacionado a progenitores de melanócitos e progenitores neurais. Quanto aos marcadores epidermais, obteve-se resultado positivo para Krt-14 e Krt-19, marcadores de queratinócitos indiferenciados da camada basal e precursores de queratinócitos do bulge, respectivamente. Já para a Krt-15, marcador de CTs do bulge, houve variação nos resultados, sendo que em apenas uma das amostras obteve-se resultado positivo para este marcador. Foi observada ainda marcação positiva para Nestina, marcador de CN e de CTs neurais (Figura 06).

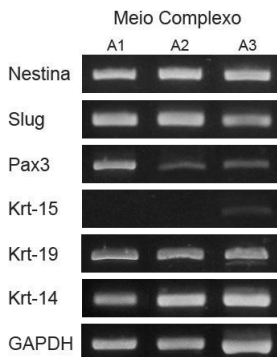


Figura 06. Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos obtidos por RT-PCR com células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura. Foi analisada a expressão dos seguintes marcadores: Nestina, Slug, Pax-3, Krt-15, Krt-19, Krt-14 e GAPDH. (A1, A2, A3): indicam diferentes amostras em que foi realizada a análise.

As análise de imunocitoquímica (n=3) revelaram marcação positiva para Krt-14, p75 e β -Tubulina III nas culturas fixadas com 14 dias. Observou-se que cerca de 70% das células foram positivas para β -Tubulina III e 50% para p75, havendo co-expressão entre estes dois marcadores. Apesar de a β -Tubulina III ser considerada um marcador neuronal, a marcação para esta proteína foi observada em filamentos do citoesqueleto acompanhando as morfologias alongada e fibroblastóide (figura 07 B) e quadrangular (Figura 07 F). É importante destacar que todas as células positivas para p75 também expressavam β -Tubulina III, mas nem sempre a recíproca ocorria (Figura 07 A-H). Foi também obtida marcação para Krt-14 (cerca de 30% do total de células), observada principalmente na população celular com formato quadrangular, localizada próximo ao folículo (Figura 08 D, seta azul; E, seta branca). Nas culturas onde esta população não foi observada, não se obteve marcação para esta citoqueratina. Por outro lado, nos casos em que houve mudança estrutural do folículo, foi observado que a população celular positiva para Krt-14 encontrava-se ao redor da região alterada, possivelmente acompanhando o processo (dado não apresentado). Além disso, é importante destacar que, nas células em cultura, não foi observada co-expressão entre Krt14 e β -Tubulina III/p75 (Figura 08), e nem marcação para Krt15 e CD34, ambos marcadores de

CTs do bulge. Contudo, dentro dos explantes dos folículos foram observadas células positivas para estes marcadores, demonstrando que estas não migram para a placa de cultura nas condições utilizadas.

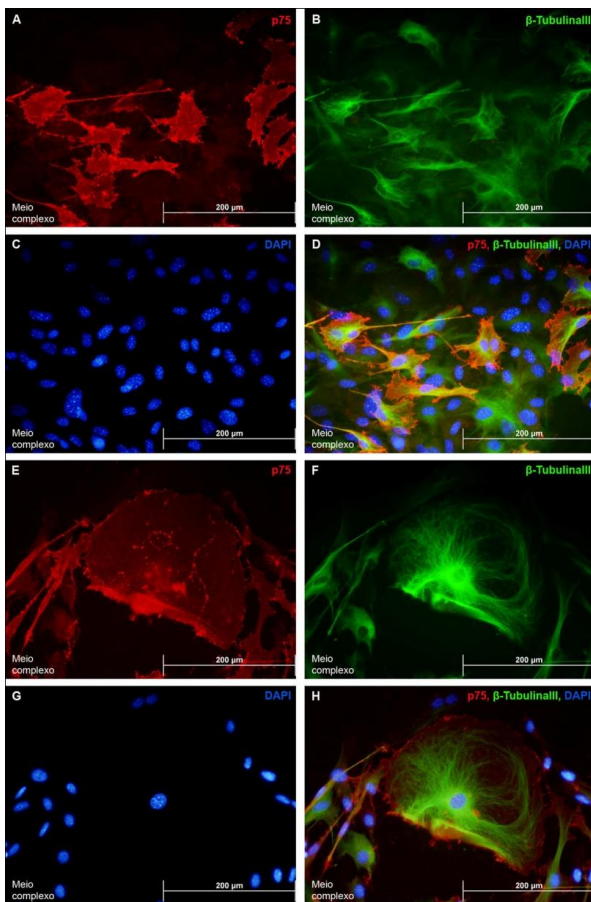


Figura 07. Expressão de p75 e β -Tubulina III por imunocitoquímica nas células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura. Observa-se que há expressão de p75 (A, E) e β -Tubulina III (B, F). Algumas células (sobreposição em D e H) co-expressam estes dois marcadores, embora algumas das células β -Tubulina III positivas não expressem p75. (C, G) demonstram a marcação de núcleos totais com DAPI.

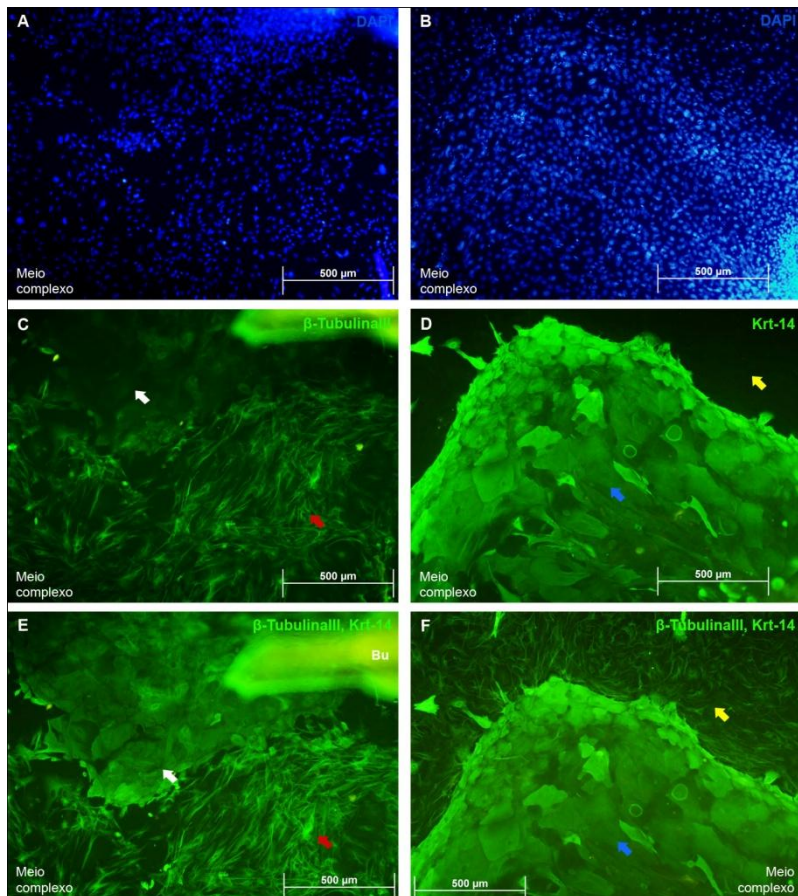


Figura 08. Expressão de Krt-14 e β -Tubulina III nas células tratadas com meio complexo, aos 14 dias de cultura. Observa-se a expressão de Krt-14 em uma população celular localizada próximo ao explante e com morfologia de queratinócitos (D, F, setas azuis; E, seta branca). Na região periférica, encontra-se uma população positiva para β -Tubulina III (C, E, setas vermelhas; F, seta amarela). Não há co-expressão destes marcadores (E, F). (A, B) demonstram a marcação de núcleos totais com DAPI. (Bu): Bulge.

5.2. Os meios de cultura CnT-02 e CnT-07 levam a mudanças morfológicas e na expressão de marcadores nas culturas de explante de vibrissas de camundongo

Como o tratamento com os meios CnT-02 e CnT-07 no início da cultura não permitia a adesão dos folículos pilosos na placa de cultura, foi utilizado um protocolo alternativo de tratamento, em que as culturas eram mantidas em meio complexo nos dez primeiros dias de cultivo e, então, este era substituídos por CnT-02 ou CnT-07.

Os resultados demonstraram que o padrão de migração das células para placa de cultura após a troca dos meios para CnT-02 ou CnT-07 manteve-se semelhante ao observado em meio complexo (Figura 09). Por outro lado, alterações morfológicas nas células submetidas aos tratamentos com os meios para queratinócitos já podiam ser observadas 24 horas após a troca dos meios. Em ambos os tratamentos (com CnT-02 e com CnT-07), foi observado que a maior parte das células se tornaram afiladas, com um formato fibroblastóide (Figura 09 B, D, setas azuis), enquanto que outras se tornaram menores e com formato quadrangular, uma morfologia semelhante à de queratinócitos diferenciados (Figura 09 B, D, setas pretas). Nesta condição experimental, foi observado ainda aumento na quantidade de células que perdem a adesão com a placa de cultura e formam grumos (Figura 09 B, D, setas vermelhas). Para investigar melhor estas mudanças, foram realizadas análises por imunocitoquímica e RT-PCR.

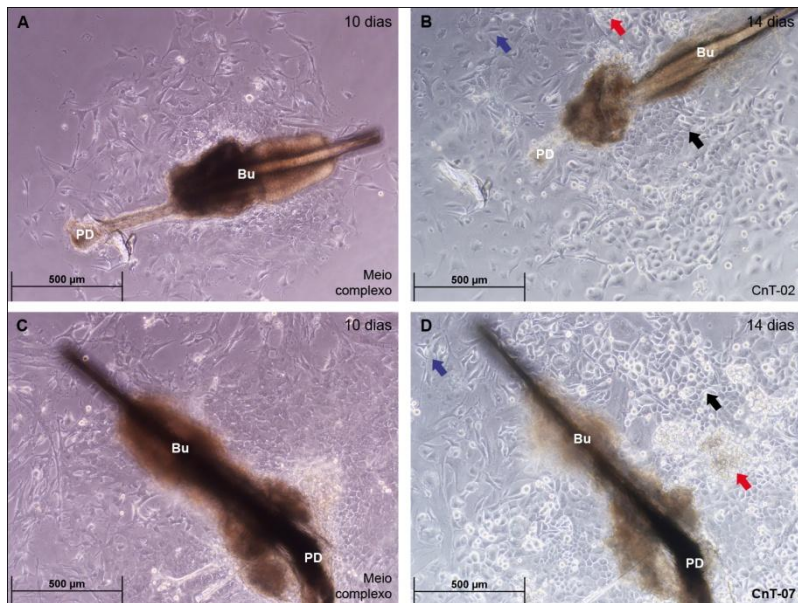


Figura 09. Morfologia das células tratadas com meios CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura. Células com 10 dias de cultura em meio complexo (A) e com 14 dias (C), 4 dias após a troca pelos meios CnT02 (B) e CnT-07 (D), que propiciam o desenvolvimento de queratinócitos. As células localizadas próximo ao explante adquirem uma morfologia semelhante à de queratinócitos diferenciados (setas pretas), enquanto as que se encontram na periferia adquirem uma morfologia mais alongada (setas azuis). Estas observações foram feitas em ambas as condições experimentais, CnT-02 e CnT-07. Além disso, é possível observar que algumas células perdem a adesão à placa de cultura, podendo permanecer sozinhas ou formar grumos (setas vermelhas). (Bu): Bulge; (PD): Papila dérmica.

As análises por RT-PCR (Figura 10) (n=3) revelaram que as células tratadas com os meios CnT-02 ou CnT-07 foram positivas para Slug. Já para Pax-3, houve variação nos resultados entre as amostras: nas células tratadas com CnT-02, obteve-se resultado negativo em duas amostras e positivo em um terceiro experimento. Para CnT-07, foram obtidos dois resultados positivos e um negativo. Quanto aos marcadores epidermais, em ambos os tratamentos (CnT-02 e CnT-07) obteve-se

resultado positivo para Krt- 14 e Krt-19. Apenas em um dos experimentos, o resultado foi negativo para Krt-19, na cultura tratada com CnT-02. Houve também variação nos resultados obtidos para Krt-15. No tratamento com CnT-02, o resultado foi sempre negativo. Contudo, para CnT-07, obteve-se resultado negativo nos dois primeiros experimentos e positivo em um terceiro. Também foi observada marcação positiva para Nestina, embora em um primeiro experimento, o resultado tenha sido negativo em ambos os tratamentos (Figura 10).

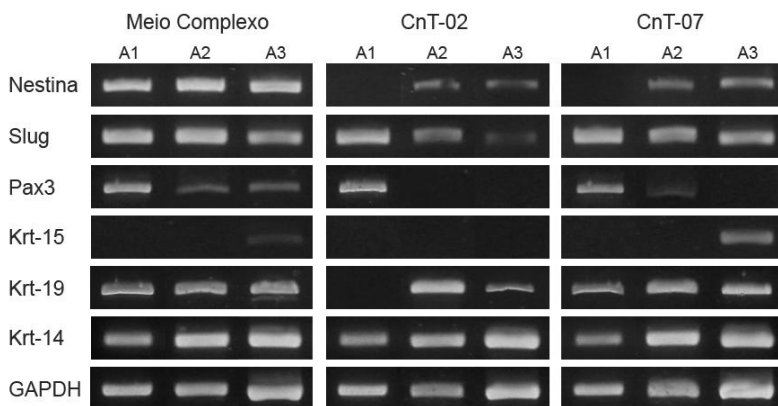


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos obtidos por RT-PCR com células tratadas com meio complexo, CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura. Foi analisada a expressão dos seguintes marcadores: Nestina, Slug, Pax-3, Krt-15, Krt-19, Krt-14 e GAPDH. Os resultados obtidos para as amostras tratadas com meio complexo foram novamente representadas no intuito de facilitar a comparação. (A1, A2, A3): indicam diferentes amostras em que foi realizada a análise.

Pela análise por imunofluorescência, foram encontradas populações positivas para a Krt-14 em ambas as condições, CnT-02 ou CnT-07. Assim como em meio complexo, as células positivas para Krt-14 representavam 30% do total de células, apresentavam morfologia semelhante a queratinócitos e foram encontradas junto ao folículo piloso (Figura 11 C, G). Em alguns poços, uma parte desta população celular possuía uma morfologia já bastante semelhante à de queratinócitos em

estágio final de diferenciação, o que não foi observado nas amostras mantidas em meio complexo (Figura 11 C, D, G, H, setas brancas). Esta situação foi encontrada tanto nas células tratadas com CnT-02, quanto com CnT-07. Quanto à Krt-15, foi encontrado resultado positivo em uma das amostras tratadas com CnT-07, embora essa marcação tenha sido observada em apenas algumas células (menos de 1%) (Figura 12 C, setas brancas). Destaca-se o fato de que estas células positivas para Krt-15 encontravam-se entre a população celular que expressa Krt-14 (Figura 12 D). Nas células tratadas com CnT-02, não se obteve marcação positiva para esta citoqueratina. Em nenhuma das condições obteve-se marcação positiva para CD34 nas células que migraram para a placa de cultura, embora tenham sido observadas células positivas dentro dos folículos (dados não demonstrados).

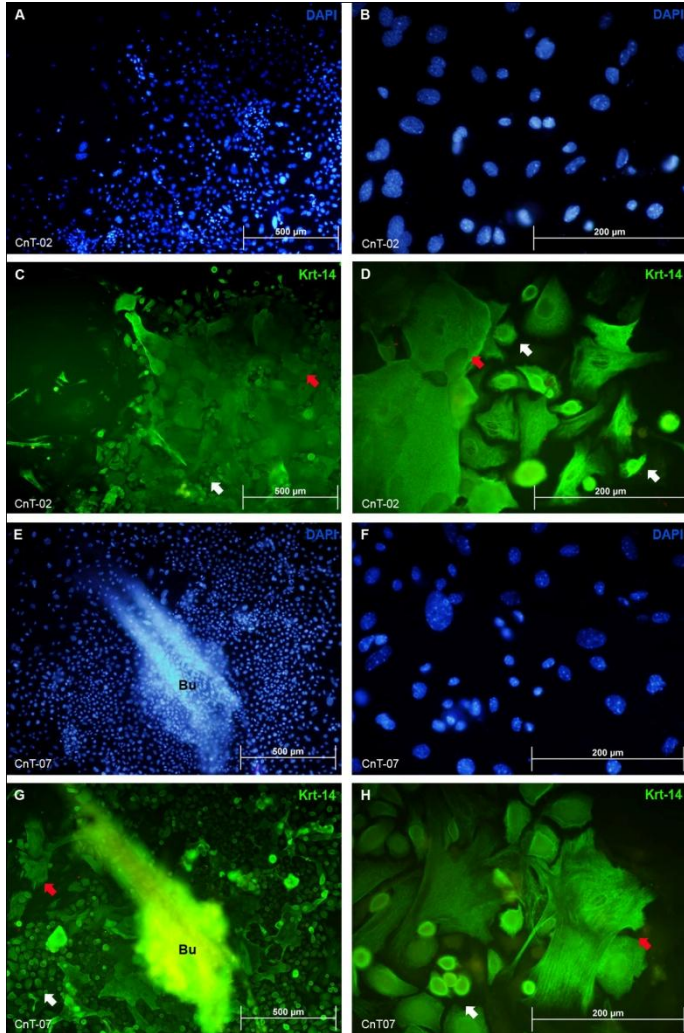


Figura 11. Expressão de Krt-14 por imunocitoquímica nas células tratadas com meios CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura. Tanto nas culturas tratadas com CnT-02 (A-D), quanto CnT-07 (E-H), as células que expressam Krt-14 encontram-se próximo ao explante e possuem morfologia semelhante à de queratinócitos indiferenciados (setas vermelhas), quanto diferenciados (setas brancas). (A, B, E, F) demonstram a marcação de núcleos totais com DAPI. (Bu): Bulge.

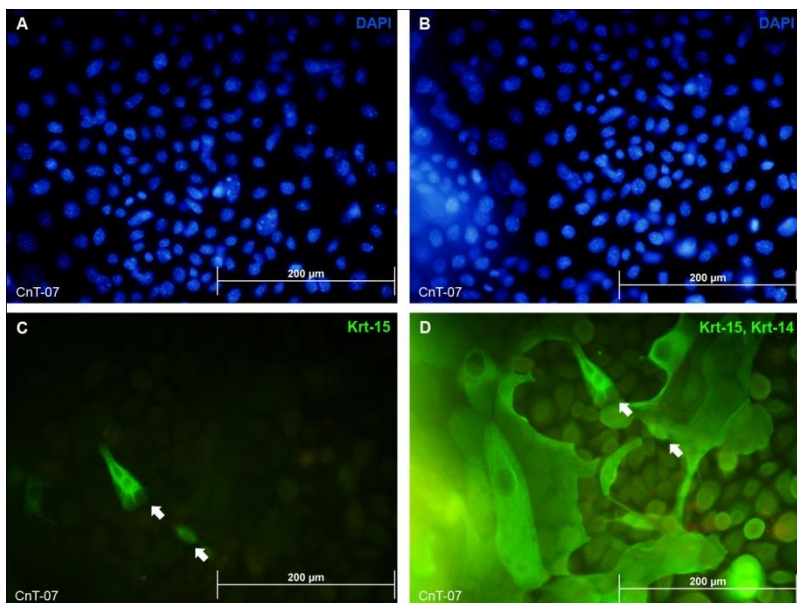


Figura 12. Expressão de Krt-15 e Krt-14 nas células tratadas com CnT-07, aos 14 dias de cultura. A expressão de Krt-15 (C) foi observada em algumas raras células (menos de 1%) (setas brancas). Destaca-se o fato de que estas células encontram-se entre a população que expressa Krt-14 (D, setas brancas). (A, B) demonstram a marcação de núcleos totais com DAPI.

Marcações positivas para p75 e β -Tubulina III foram observadas em cerca de 5% das células, proporção inferior à observada no meio complexo (redução de cerca de 10 vezes). Além disso, em algumas amostras (tanto de CnT-02, quanto de CnT-07) foram observadas células positivas para p75 com prolongamentos longos e finos, em uma morfologia semelhante à de neurônios (Figura 13 C, D). Algumas destas células também foram positivas para β -Tubulina III (Figura 13 E, F).

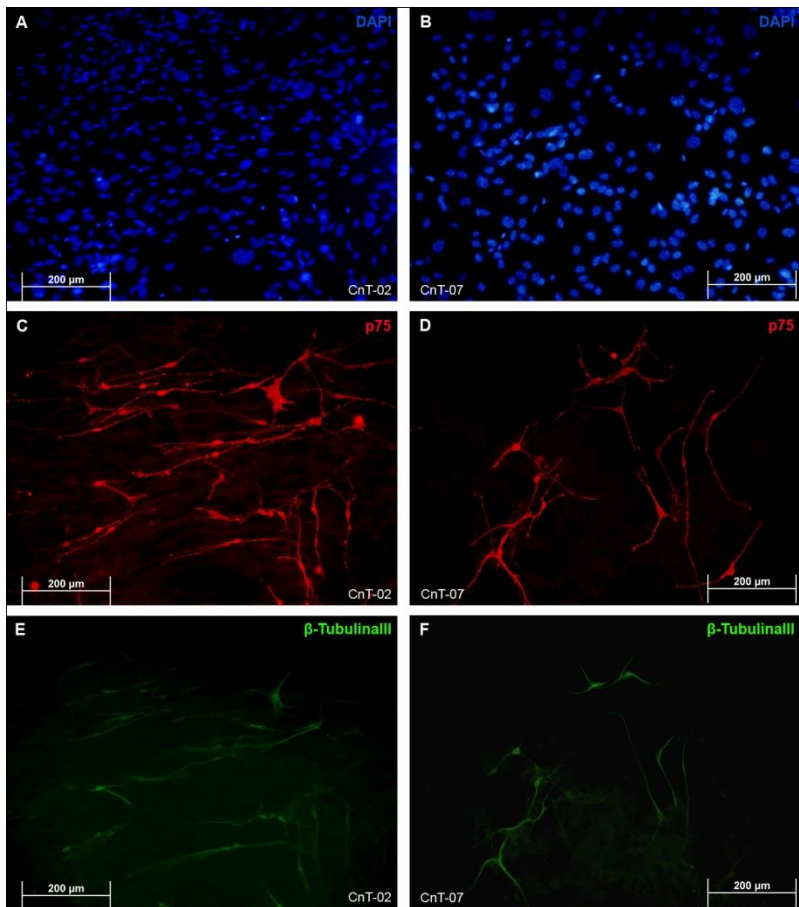


Figura 13. Expressão de p75 e β -Tubulina III nas células tratadas com CnT-02 e CnT-07, aos 14 dias de cultura. Foram obtidas células positivas para estes dois marcadores nas duas condições, destacando-se o fato de que todas as células que expressavam β -tubulina III (E, F), também expressavam p75 (C, D). É importante notar também que algumas destas células apresentavam morfologia semelhante à neuronal, uma observação que foi feita tanto nas placas tratadas com CnT-02 (C, E), quanto com CnT-07 (D, F). (A, B) demonstram a marcação de núcleos totais com DAPI.

5.3. Caracterização da população celular obtida a partir de folículos pilosos da região dorsal de camundongo

Em uma primeira etapa, foi realizado o aperfeiçoamento e adequação do protocolo disponível na literatura para obtenção de células de folículo piloso da região dorsal por dissociação direta. No que se refere à digestão enzimática, observou-se que o uso de dispase, com um período de incubação de 5h a 4°C e mais 30min à temperatura ambiente, foi a melhor condição para separar a epiderme, juntamente com os folículos pilosos, da derme. Após a dissociação do material coletado, foi realizada contagem de células em câmara de Neubauer. Foram obtidas, em média, 6×10^6 células a partir de uma porção de aproximadamente 3x2cm de pele (tamanho do tecido que era coletado de cada animal).

Por RT-PCR (n=1), obteve-se marcação positiva para as Krt-15, Krt-19 e Krt-14. O resultado também foi positivo para o marcador de CN Slug. Contudo, para Nestina o resultado foi negativo (Figura 14 A).

Por citometria de fluxo (n=1), foi feita, primeiramente, uma análise do perfil das células obtidas quanto à granulosidade e ao tamanho. Esta verificação prévia nos permite eliminar da leitura fragmentos de células e grumos e selecionar apenas a população celular de interesse (Figura 14 B). A partir desta amostra selecionada foi feita a análise da expressão de marcadores. Observou-se que 4,67% das células apresentou marcação positiva para CD34 (Figura 14 C) e que 5,52% foi positivo para p75 (Figura 14 D). Além disso, 3,95% das células co-expressavam CD34 e p75 (Figura 14 E).

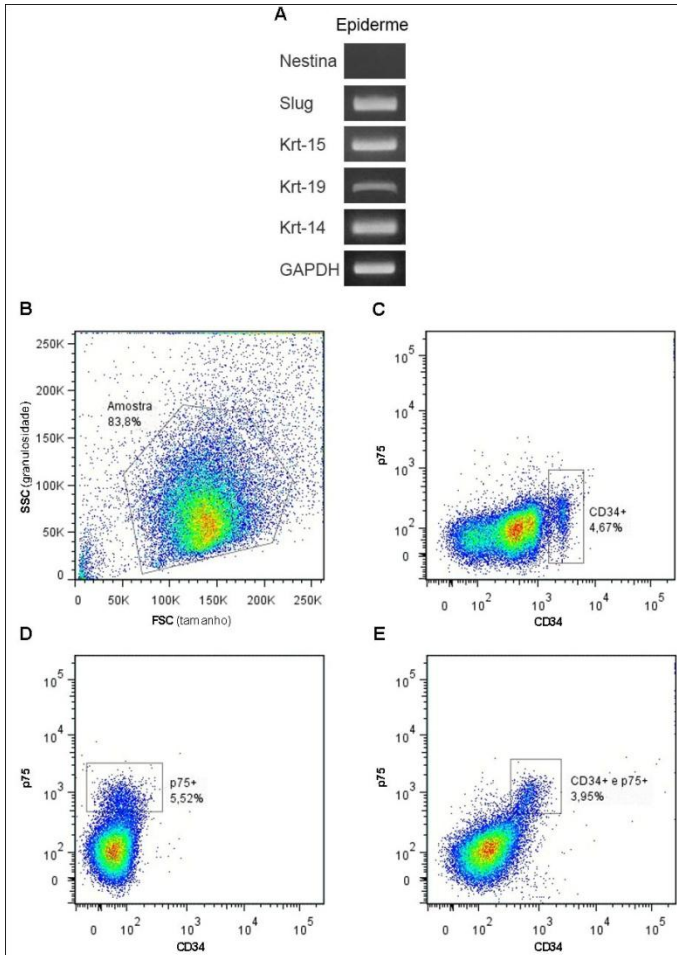


Figura 14. Expressão gênica e protéica da população celular obtida a partir de folículos pilosos da região dorsal. Por RT-PCR (A), foi verificada a expressão dos seguintes marcadores: Nestina, Slug, Krt-15, Krt-19, Krt-14 e GAPDH. Por citometria de fluxo, foi analisada a granulose (SSC) e tamanho das células (B). Esta avaliação permite eliminar fragmentos celulares e grumos, selecionando apenas a população que se deseja analisar, a qual, neste caso, correspondeu a 83,8% da amostra. Também por citometria de fluxo, foi observado que 4,67% das células foram positivas para CD34 (C), 5,52% foram positivas para p75 (D) e que 3,95% das células co-expressam estes marcadores (E).

6. DISCUSSÃO

Pela análise dos resultados, foi possível confirmar que o folículo piloso possui um conjunto heterogêneo de CTs, as quais podem ser obtidas a partir de diferentes metodologias. Os resultados obtidos demonstram que cada um dos protocolos avaliados possui características próprias e permitem a obtenção de populações celulares diferentes, que serão discutidas a seguir.

6.1. Duas populações de células-tronco são obtidas através de cultura de explante de vibrissas de camundongo

A partir da cultura de explante de folículos pilosos de vibrissas de camundongos, obtiveram-se duas populações celulares distintas, uma com características de células derivadas da CN e outra com características epidérmicas. Vamos primeiramente avaliar os dados referentes à população com características de CN.

6.1.1. Obtenção de células semelhantes à crista neural

Ao analisarmos os resultados, observamos que, na população celular que migra/prolifera a partir dos explantes de folículo piloso, há a expressão do gene *Slug*, um fator de transcrição presente em células migratórias da CN de camundongos (Savagner *et al.*, 1998). Por imunocitoquímica, foi observada a expressão do receptor de baixa afinidade das neurotrofinas, p75, também considerado marcador de células da CN. Estes resultados sugerem que a metodologia utilizada foi eficiente para obtenção uma população celular semelhante à CN embrionária.

Além disso, foi também identificada a expressão de marcadores de precursores neurais e melanocíticos, tipos celulares que são originados pela CN. Por RT-PCR, foi verificada a expressão de *Nestina*, marcador de progenitores neurais, e de *Pax-3*, um fator de transcrição que é expresso em células da CN precursoras de fenótipos neurais e de melanócitos. Além disso, por imunocitoquímica, foi observada a expressão de β -Tubulina III, também marcador neural. A análise destes

resultados demonstra que, dentre as células semelhantes à CN, encontram-se possíveis precursores neurais e melanocíticos.

A presença de células derivadas da CN, bem como de precursores neurais e melanocíticos em folículos pilosos já está descrita na literatura (Sieber-Blum *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2006). Da mesma forma, a obtenção destas células a partir de cultura de explantes foliculares também já foi descrita e caracterizada em trabalhos anteriores (Sieber-Blum *et al.*, 2004), demonstrando que os resultados do presente trabalho são consistentes e estão de acordo com estudos já realizados. Embora o enfoque deste trabalho seja a obtenção de fenótipos epidermais, é preciso destacar o potencial que a obtenção da população celular semelhante à CN representa, uma vez que existem trabalho em que se estuda a possibilidade de uso destes precursores em terapias celulares. Em trabalho publicado em 2008, Amoh e colaboradores demonstraram que a inoculação de células isoladas de folículos pilosos murinos que expressam Nestina em regiões lesionadas dos nervos ciático e tibial de camundongos auxilia na regeneração do tecido nervoso e recuperação da função nervosa (Amoh *et al.*, 2008).

6.1.2. Obtenção de precursores epidermais

Ao analisarmos a expressão de CD34, observamos que não foram obtidas células que expressam este marcador na população celular que migra a partir dos folículos pilosos. Desta forma, constatamos que as células positivas para CD34 não possuem capacidade de migrar *in vitro*, nas condições utilizadas neste trabalho. Este resultado está de acordo com informações disponíveis na literatura, que sugerem que estas células, embora tenham capacidade migratória *in vivo*, não o fazem *in vitro*, em modelos de cultura semelhantes ao usado no presente trabalho (Hu *et al.*, 2006, Drewa *et al.*, 2009).

Por outro lado, ao analisarmos a expressão de diferentes tipos de citoqueratinas, foi observada a expressão de Krt-19, marcador de CTs do bulge precursoras de queratinócitos, por RT-PCR. Além disso, tanto por RT-PCR, quanto por imunocitoquímica, foi constatada a expressão de Krt-14, que é expressa na bainha radicular externa folicular e considerada marcador de queratinócitos indiferenciados. Quanto à

expressão de Krt-15, também marcador de CTs do bulge, houve resultado positivo em apenas uma das amostras analisadas por RT-PCR. Por imunocitoquímica, não se obteve marcação nas células que migram a partir do folículo, embora tenham sido observadas células positivas para Krt-15 dentro dos explantes.

A verificação da presença destes três tipos de citoqueratinas no material obtido nos permite constatar que a metodologia utilizada foi eficiente para obtenção de uma população celular que migra/prolifera a partir do folículo piloso capaz de formar fenótipos epidermais. Destaca-se o fato de que a presença de tais progenitores no folículo piloso já havia sido relatada em trabalhos anteriores (Larouche *et al.*, 2008), contudo a observação de que estes precursores possuem a capacidade de migrar e proliferar a partir de explantes em cultura é um fato inédito, ainda não descrito na literatura.

Além da constatação da eficiência do protocolo para obtenção de fenótipos epidermais, os resultados obtidos nos permitem fazer algumas considerações e levantar alguns questionamentos sobre o reservatório de CTs com potencialidade para fenótipos epidermais que existe no folículo piloso.

Os resultados sugerem, primeiramente, que esta população não é homogênea, mas sim composta por diferentes precursores, os quais possuem características e potencialidades diferentes, sendo sensíveis a diferentes indutores. Constatamos que há uma população progenitora positiva para CD34, a qual não possui capacidade de migrar *in vitro*, permanecendo no explante do folículo piloso, e outra que expressa diferentes tipos de citoqueratinas e possui capacidade migratória nas condições utilizadas.

É interessante destacar que a expressão de Krt-15, um marcador de CTs do bulge, na população celular que migra/prolifera a partir dos explantes foi verificada em apenas uma das amostras. Isso nos permite levantar duas hipóteses: (1) as células precursoras que expressam Krt-15 possuem baixa capacidade de migrar/proliferar *in vitro*, nas condições de estudo utilizadas; (2) estas células possuem a capacidade de migrar, contudo reduzem a expressão desta citoqueratina após deixarem o

folículo. Uma observação que reforça esta segunda hipótese é o fato de que há estudos que demonstram a existência de uma população celular que co-expressa Krt-15 e Krt-19 na região do bulge (Larouche *et al.*, 2008), e, em nosso trabalho, foi observada a expressão de Krt-19 nas células que migram/proliferam a partir dos explantes.

Outra avaliação que pode ser feita refere-se ao papel destes progenitores dentro do próprio folículo piloso. Nos casos em que houve mudança estrutural do folículo, observou-se que a população celular positiva para Krt-14 encontra-se em volta desta estrutura em modificação, possivelmente acompanhando as alterações que se desenvolviam. Isso sugere que estas células possam migrar dentro do próprio folículo e participar do processo de regeneração folicular, embora sejam necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

6.1.3. Efeitos dos meios CnT-02 e CnT-07 nas culturas de explante de folículos pilosos de vibrissas de camundongos

A obtenção de tipos celulares que expressam marcadores de diferentes células progenitoras confirma que o folículo piloso é uma fonte viável e alternativa de CTs com potencial para uso em terapias celulares para medicina regenerativa. Como em nosso laboratório está em desenvolvimento o projeto de pesquisa “Avaliação do potencial terapêutico e biotecnológico de células-tronco isoladas de folículo piloso humano”, que estuda a regeneração tecidual para futura aplicação em pacientes que sofreram queimadura em grande área, foi dado maior enfoque para obtenção de fenótipos epidermais. Assim, foram utilizados os meios CnT-02 e CnT-07 com o objetivo de otimizar a obtenção destas células, estimulando sua proliferação e avaliando sua capacidade de diferenciação celular.

É importante destacar que, como estes meios são comerciais, sua composição exata não é fornecida pelo fabricante. O meio CnT-02 é indicado para isolamento e diferenciação de queratinócitos, enquanto CnT-07 é indicado para isolamento e crescimento destas células. Apesar destas diferentes recomendações, em nossos experimentos os efeitos destes dois meios foram semelhantes e, por isso, serão analisados conjuntamente. Além disso, é importante lembrar que as culturas de

células foram mantidas em meio complexo nos primeiros dez dias e que, somente após este período, este foi substituído por CnT-02 ou CnT-07. Como nesta primeira etapa do tratamento há a proliferação de células semelhantes à CN e de células com características epidérmicas, os resultados correspondem aos efeitos dos meios CnT-02 e CnT-07 sobre essas populações celulares.

O primeiro efeito observado após o início do tratamento com os meios CnT-02 ou CnT-07 foi a mudança de morfologia das células, o que pode ser detectado já nas primeiras 24 horas após a troca do meio. Este resultado indica que ocorreram alterações no metabolismo e no funcionamento celular. As células localizadas próximo ao explante adquiriram morfologia poligonal bastante acentuada, semelhante à de queratinócitos diferenciados.

Os resultados referentes à expressão das citoqueratinas (Krt-14, Krt-15 e Krt-19) foram semelhantes aos obtidos para as células mantidas em meio complexo. Destaca-se, porém, o fato de que, por imunocitoquímica, foram observadas células positivas para Krt-15 em uma das amostras tratadas com CnT-07. Estas células estavam presentes em uma proporção extremamente baixa e encontravam-se entre a população celular positiva para Krt-14, o que reforça a hipótese levantada anteriormente de que as células que expressam Krt-15 poderiam ser precursoras das células positivas para Krt-19 e Krt-14 que migram a partir do folículo em cultura.

Contudo, é importante salientar que não foi observada alteração na proliferação destas células após o tratamento com os meios CnT-02 e CnT-07. Desse modo, a utilização destes meios parece ser eficiente para promover a diferenciação dos queratinócitos, mas não para aumentar sua quantidade, o que é um fator limitante para a aplicação futura em terapias celulares e que precisa ser abordado em projetos futuros.

Apesar de o objetivo deste trabalho ser a análise do efeito destes meios sobre os fenótipos epidérmicos, também foi avaliado o efeito causado sobre as células semelhantes à CN. Quando as culturas foram tratadas com os meios CnT-02 e CnT-07, a marcação de Slug foi

mantida, indicando que a presença de células semelhantes à CN era mantida.

Contudo, houve variação nos resultados obtidos para Pax3, fator de transcrição que é expresso tanto em precursores neurais quanto melanocíticos, não sendo identificada a expressão deste gene em algumas amostras, o que pode sugerir duas possibilidades. (1) Na primeira, os meios CnT-02 e CnT-07 podem induzir um processo apoptótico nestas células e, assim, haveria redução destas populações. (2) Outra possibilidade seria de que estes meios, embora destinados à obtenção e cultivo de queratinócitos, poderiam conter algum fator indutor de diferenciação destes precursores semelhantes à CN. Em trabalho publicado em 2002, Baker e colaboradores demonstram que a expressão de Pax3 em certos precursores neurais derivados da CN é reduzida quando estas células entram em um processo de diferenciação celular (Baker *et al.*, 2002).

Além de Pax3, outro marcador de precursores neurais encontrado nas células que se desenvolveram a partir do folículo foi a proteína de neurofilamento intermediário, Nestina. Assim, como no caso de Pax3, houve variação nos resultados obtidos por RT-PCR, sendo que, em uma das amostras, o resultado foi negativo nas culturas tratadas com CnT-02 e CnT-07. Além disso, pode-se notar que, mesmo quando houve resultado positivo, o sinal obtido foi mais fraco do que o encontrado para as células mantidas em meio complexo. Assim, as mesmas hipóteses apresentadas no parágrafo acima para explicar a variação da marcação de Pax3 entre as amostras podem ser aplicadas aqui.

Outro resultado que reforça esta hipótese de diferenciação dos precursores semelhantes à CN é a observação de marcação dupla para p75 e do marcador neuronal β -Tubulina III em células com morfologia neuronal após o tratamento CnT-02 ou CnT-07.

Entretanto, é preciso destacar que, embora seja possível que os meios CnT-02 e CnT-07 tenham promovido uma diferenciação semelhante à neuronal, estes meios não são adequados para tal processo. Isso se torna evidente pela sensível redução na quantidade de células

que expressam p75 nestas culturas quando comparadas com as mantidas em meio complexo (redução de cerca de 10 vezes).

6.2. Obtenção de células epidermais e semelhantes à crista neural a partir de folículos pilosos da região dorsal de camundongo

Os resultados obtidos sugerem que o protocolo utilizado foi eficiente para obtenção de células de folículos pilosos da região dorsal de camundongos, entre as quais se encontram populações de CTs. Estas células foram obtidas por digestão enzimática e dissociação direta do tecido epidermal para obtenção de um *pool* celular, contendo várias populações, tanto foliculares, quanto epidermais. Desse modo, há necessidade de novo processamento para isolamento e purificação dos fenótipos desejados. Vamos agora analisar algumas das populações obtidas por este procedimento e suas características.

Os resultados obtidos nos indicam que, através da metodologia utilizada, foram obtidas células semelhantes à CN, que expressam Slug (resultado observado por RT-PCR) e p75 (obtido por citometria de fluxo).

Curiosamente, não foi obtida por RT-PCR marcação para Nestina, o que pode sugerir que o procedimento não foi eficiente para obtenção de progenitores que expressam este marcador. Contudo, em trabalho publicado em 2005, Amoh e colaboradores, utilizando um protocolo semelhante ao nosso, obtiveram células positivas para esta proteína a partir de folículos pilosos da região dorsal de camundongos. Neste trabalho, é demonstrado ainda que há células que co-expressam Nestina e CD34 (Amoh *et al.*, 2005). Por isso, acreditamos que o resultado negativo obtido em nosso trabalho possa corresponder a um artefato metodológico.

Quanto aos marcadores epidermais, observamos a presença de marcadores de CTs/progenitoras epidermais (Krt-15 e Krt-19) e de queratinócitos indiferenciados (Krt-14). Contudo, por este protocolo, é feito um *pool* celular da epiderme como um todo, incluindo os folículos pilosos. Desse modo, estes precursores podem ser originados de outros

nichos fora do folículo piloso, como da epiderme interfolicular. A presença de células CD34 positivas através de citometria de fluxo, no entanto, confirma a obtenção de CTs do folículo piloso. Este resultado está de acordo com dados da literatura (Nowak e Fuchs, 2009; Lorz *et al.*, 2010), confirmando a eficiência desta metodologia. Assim, a perspectiva de continuação deste estudo corresponde ao isolamento destas células positivas para CD34 através de micropartículas magnéticas conjugadas a anticorpos específicos, protocolo já descrito e utilizado na literatura (Lorz *et al.*, 2010), e a avaliação da possibilidade do uso destas células em futuras terapias de regeneração. Uma das possibilidades é a associação destas células com matrizes de regeneração dérmica, o que poderia auxiliar na recuperação de pacientes com lesões extensas na pele, como é o caso de grandes queimaduras.

No entanto, o resultado de maior destaque e inédito na literatura foi a obtenção de uma população celular que co-expressa CD34 e p75. Embora este seja um resultado inicial, destaca-se o fato de estas células apresentarem simultaneamente a expressão de marcadores epidermais e da CN. Como citado anteriormente, em trabalho publicado em 2005, Amoh e colaboradores isolaram células de folículos pilosos que co-expressam CD34 e Nestina, também marcador de CN e de precursores neurais. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que estas células possuem a capacidade de originar neurônios (Amoh *et al.*, 2005). Assim, o próximo passo previsto para esta pesquisa será confirmar a co-expressão de CD34 e p75 em células do folículo piloso através de imunocitoquímica de fluorescência e posterior análise por microscopia confocal. Em seguida, pretende-se avaliar a potencialidade de diferenciação celular desta população e sua capacidade de autorrenovação *in vitro*.

6.3. Análise comparativa entre as metodologias utilizadas com vista para uma futura aplicação em terapias celulares de regeneração

Dentro do projeto geral que está em desenvolvimento em nosso laboratório, com vista para o estudo da aplicação de CTs em terapias de regeneração da pele em pacientes que sofreram grandes queimaduras, acreditamos que a segunda metodologia, de obtenção de células a partir da digestão enzimática dos folículos pilosos, se mostrou mais eficiente.

Isso porque: (1) foram obtidas células positivas para CD34, as quais já foram caracterizadas por sua capacidade de regenerar a epiderme como um todo (Blanpain *et al.*, 2004), e (2) o protocolo mostrou-se mais simples e rápido, uma vez que as células foram obtidas por simples dissociação enzimática, não sendo necessário um período de cultivo, uma característica importante considerando-se o objetivo utilizar este material em futuras terapias de regeneração.

7. CONCLUSÕES

- O folículo piloso possui um conjunto heterogêneo de CTs;
- Pela cultura de explante de folículos pilosos de vibrissas de camundongo, foram obtidas células semelhantes à CN, entre as quais se encontram precursores neurais e melanocíticos, e células precursoras epidermais;
- O tratamento das células obtidas a partir da cultura de explante de folículos pilosos com os meios CnT-02 e CnT-07 parece estimular o processo de diferenciação em precursores de queratinócitos, contudo não teve efeito sobre a proliferação celular;
- Pelo protocolo de obtenção de células de folículos pilosos da região dorsal de camundongos, foram obtidas células precursoras epidermais e também células semelhantes à CN;
- O protocolo de obtenção de células de folículos pilosos da região dorsal de camundongos se mostrou mais eficiente para uso em estudos de regeneração tecidual, tendo em vista os tipos celulares obtidos, a quantidade de CTs e a facilidade de realização do protocolo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOH, Y.; KATSUOKA, K.; PENMAN, S.; HOFFMAN, R.M. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, n. 15, p. 5530-4, 2005.

AMOH, Y.; LI, L.; KATSUOKA, K.; HOFFMAN, R.M. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. **Cell cycle**. v. 7, n. 12, p. 1865-9, 2008.

BAKER, C.V.; STARK, M.R.; BRONNER-FRASER, M. Pax3-expressing trigeminal placode cells can localize to trunk neural crest sites but are committed to a cutaneous sensory neuron fate. **Developmental biology**. v. 249, n. 2, p. 219-36, 2002.

BLANPAIN, C.; LOWRY, W.E.; GEOGHEGAN, A.; POLAK, L.; FUCHS, E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**. v. 118, n. 5, p. 635-48, 2004.

BLANPLAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal Homeostasis: a balancing act of stem cells in skin. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. v. 10, n. 3, p. 207-17, 2009.

BOTCHKAREVA, N.V.; BOTCHKAREV, V.A.; CHEN, L.H.; LINDNER, G.; PAUS, R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. **Developmental biology**. v. 216, n. 1, p. 135-53, 1999.

COSTA-SILVA, B.; DA COSTA, M.C.; MELO, F.R.; NEVES, C.M.; ALVAREZ-SILVA, M.; CALLONI, G.W.; TRENTIN, A.G. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Experimental Cell Research**. v. 315, n. 6, p. 955-67, 2009

DREWA, T.; JOACHIMIAK, R.; KAZNICA, A.; SARAFIAN, V.; SIR, J. Primary cultures from rat vibrissae as a potential cell source for in vitro construction of urinary bladder wall grafts. **Transplantation proceedings**. v. 41, n. 5, p. 1932-5, 2009.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 143-55, 2000.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**. v. 445, n. 7130, p. 834-42, 2007.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **The Journal of cell biology**. v. 180, n. 2 p. 273-84, 2008.

FUCHS, E.; NOWAK, J.A. Building epithelial tissues from skin stem cells. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. v. 73, p. 333-50, 2008.

GRECO, V.; CHEN, T.; RENDL, M.; SHOBER, M.; PASOLLI, H.A.; STOKES, N.; DELA CRUZ-RACELIS, L.; FUCHS, E. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. **Cell Stem Cell**. v. 4, n. 2, p. 155-69, 2009.

HALL, B.K. **The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution**. 2. ed. New York: *Springer Science+Business Media*, 2009. 400p.

HSU, Y.C.; PASOLLI, H.A.; FUCHS, E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. **Cell**. v. 144, n. 1, p. 92-105, 2011.

HU, Y.F.; ZHANG, Z.J.; SIEBER-BLUM, M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. **Stem cells**. v. 24, n. 12, p. 2692-702, 2006.

HUANG, E.; LIAN, X.; CHEN, W.; YANG, T.; YANG, L. Characterization of rat hair follicle stem cells selected by vario magnetic

activated cell sorting system. **Acta Histochemica et Cytochemica**. v. 42, n. 5, p. 129-36, 2009.

KOBAYASHI, K.; ROCHAT, A.; BARRANDON, Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 15, p. 7391-5, 1993.

LAROCHE, D.; TONG, X.; FRADETTE, J.; COULOMBE, P.A.; GERMAIN, L. Vibrissa hair bulge houses two populations of skin epithelial stem cells distinct by their keratin profile. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 22, n. 5, p. 1404-15, 2008.

LE DOUARIN, N.M.; ZILLER, C.; COULY, G.F. Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. **Developmental biology**. v. 159, n. 1, p. 24-49, 1993.

LE DOUARIN, N.M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2. ed. Cambridge, UK: *Cambridge University Press*, 1999. 445 p.

LEVY, V.; LINDON, C.; ZHENG, Y.; HARFE, B.D.; MORGAN B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. **The FASEB journal: official publication of the federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 21, n.7, p. 1558-66, 2007.

LIU, Y.; LYLE, S.; YANG, Z.; COTSARELIS, G. Keratin 15 targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. **The Journal of investigative dermatology**. v. 121, n. 5, p. 963-8, 2003.

LORZ, C.; SEGRELLES, C.; GARÍN, M.; PARAMIO, J.M. Isolation of adult mouse stem keratinocytes using magnetic cell sorting (MACS). **Methods in molecular biology**. v. 585, p. 1-11, 2010.

MICHEL, M.; TÖRÖK, N.; GODBOUT, M.J.; LUSSIER, M.; GAUDREAU, P.; ROYAL, A.; GERMAIN, L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19

expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. **Journal of cell science**. v. 109, n. 5, p. 1017-28, 1996.

MORRIS, R.S.; LIU, Y.; MARLES, L.; YANG, Z.; TREMPUS, C.; LI, S.; LIN, J.S.; SAWICKI, J.A.; COTSARELIS, G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. **Nature Biotechnology**. v. 22, n. 4, p. 411-7, 2004.

NOWAK, J.A.; FUCHS, E. Isolation and culture of epithelial stem cells. **Methods in molecular biology**. v. 482, p. 215-32, 2009.

PAUS, R.; MÜLLER-RÖVER, S.; VAN DER VEEN, C.; MAURER, M.; EICHMÜLLER, S.; LING, G.; HOFMANN, U.; FOITZIK, K.; MECKLENBURG, L.; HANDJISKI, B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. **The Journal of investigative dermatology**. v. 113, n. 4 p. 523-32, 1999.

PETERS, E.M.; TOBIN, D.J.; BOTCHKAREVA, N.; MAURER, M.; PAUS, R. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of Histochemistry Society**. v. 50, n. 6, p. 751-66, 2002.

SAVAGNER, P.; KARAVANOVA, I.; PERANTONI, A.; THIERY, J.P.; YAMADA, K.M. Slug mRNA is expressed by specific mesodermal derivatives during rodent organogenesis. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**. v. 213, n. 2, p. 182-7, 1998.

SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**. v. 27, n. 3, p. 247-61, 2005.

SCHNEIDER, M.R.; SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. **Current Biology: CB**. v. 19, n. 3, p. 132-42, 2009.

SIEBER-BLUM, M.; GRIM, M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. **Birth Defects Research. Part C, Embrio Today: Reviews**. v. 72, n. 2, p. 162-72, 2004.

SIEBER-BLUM, M.; GRIM, M.; HU, Y.F.; SZEDER, V. Pluripotent Neural Crest Stem Cells in the Adult Hair Follicle. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**. v. 231, n. 2, p. 258-69, 2004.

SLACK, J. Skinny dipping for stem cells. **Nature cell biology**. v. 3, n. 9, p 205-6, 2001.

SUNDBERG, J.P.; KING, L.E.Jr. Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research. **The Journal of investigative dermatology**. v. 106, n. 2, p. 368-76, 1996.

TREMPUS, C.S.; MORRIS, R.J.; BORTNER, C.D.; COTSARELIS, G.; FAIRCLOTH, R.S.; REECE, J.M.; TENNANT, R.W. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. **The Journal of investigative dermatology**. v. 120, n. 4, p. 501-11, 2003.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**.v. 116, n. 5, p. 639-48, 2004.

WONG, C.E.; PARATORE, C.; DOURS-ZIMMERMANN, M.T.; ROCHAT, A.; PIETRI, T.; SUTER, U.; ZIMMERMANN, D.R.; DUFOUR, S.; THIERY, J.P.; MEIJER, D.; BEERMANN, F.; BARRANDON, Y.; SOMMER, L. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **The Journal of cell biology**. v. 175, n. 6, p. 1005-15, 2006.