

Clarissa Reginato Taufer

**AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA  
NEURAL DE AVES SOBRE MATRIZES DE PURAMATRIX™**

Dissertação submetida ao Programa de  
Biologia Celular e Desenvolvimento da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento  
Orientador: Prof. Dr. Giordano Calloni

Florianópolis  
2017

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

tauffer, clarissa reginato  
Avaliação da diferenciação de células da crista  
neural de aves sobre matrizes de *paramatrix* /  
clarissa reginato tauffer ; orientador, giordano  
wosgrau calloni - sc, 2017.  
115 p.

dissertação (mestrado) - universidade federal de  
santa catarina, centro de ciências biológicas,  
programa de pós-graduação em biologia celular e do  
desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

inclui referências.

1. biologia celular e do desenvolvimento. 2.  
crista neural. 3. *paramatrix*. 4. diferenciação. i.  
calloni, giordano wosgrau. ii. universidade federal  
de santa catarina. programa de pós-graduação em  
biologia celular e do desenvolvimento. iii. título.

"Avaliação da diferenciação de células da crista neural de aves sobre matrizes de  
PuraMatric<sup>SM</sup>"

Por

Clarissa Reginao Tauler

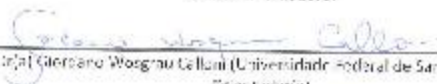
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (01/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Yara Maria Haub Müller

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

Banca examinadora:



Dr(a) Gerson Wagner Cellari (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) José Maurício de Azeiteiro – por vice (Universidade Federal do  
Rio de Janeiro)



Dr(a) Bianca Luise Teixeira (Universidade do Sul de Santa Catarina)



Dr(a) Ricardo Castilho Garcia  
(Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2017.



Este trabalho é dedicado à Maria  
Reginato e Cirilo Tafer.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador pela oportunidade de ver um laboratório crescer e pelos ensinamentos e conversas muitas vezes disfarçadas de reuniões que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC, pelo ajuda e paciência em entender meu trabalho, e assim poder me auxiliar da melhor forma possível.

Aos professores Luciane Perazzolo, Rafael Diego da Rosa, Andréa Gonçalves Trentin e Ricardo Castilho Garcez, que muitas vezes abriram as portas seus laboratórios.

À meus pais, Milton e Ivete, que suportaram o ninho vazio e minha ausência na hora do mate. Grande parte desta conquista é mérito de vocês, que confiaram e me apoiaram nesta –quase- loucura. Meu presente é o passado de vocês, e meu futuro é o futuro de vocês.

Aos colegas de caminhada científica que encontrei no LACERT e LIAA.

À minha amiga-irmã-mãe Alice Prompt, pelos cuidados e ensinamentos que vão além de crista neural e técnicas, e muito além de carinho e amor.

À Michele Rode, meu exemplo de pesquisadora, que me abraçou, cuidou e torceu por mim nessa caminhada.

À Felipe Azevedo, meu colega de laboratório e amigo. Que sua caminhada seja tão linda e incrível como você merece que seja.

Aos demais amigos que o destino me presenteou, Bianca, Diana, Diego, Flávio, Talita, Rafa, Zé, Ricardo, Jéssica, Alessandra, Maiara. Vocês tornaram minha caminhada mais leve e mais divertida e fizeram me sentir em casa e acolhida. Vocês foram minha família. Não se esqueçam e nem duvidem do quanto são importantes para mim.

Ao meu namorado, Tiago Tapparo, que me incentivou, me apoiou e que, mesmo à distância, permaneceu ao meu lado e me fortaleceu.

Aos meus sogros que também me apoiaram e me incentivaram, rezaram e torceram por mim.

Aos meus amigos de faculdade, pela amizade, pelo apoio e por ouvirem meus desabafos, mesmo que por um grupo de *whatsApp*. Vocês continuam presentes na minha vida.





A vida muda na proporção da nossa coragem.  
(Autor desconhecido)



## RESUMO

A crista neural (CN) é composta por células heterogêneas e multipotentes, e pode ser dividida em CN cefálica (CNC) e truncal (CNT). As células da CNC originam, *in vivo*, células neurais e mesenquimais, neste último caso, formando parte do esqueleto craniofacial (condrócitos, osteócitos e odontoblastos) e tecido conjuntivo da face (adipócitos e fibroblastos dermais). As células da CN truncal (CNT), por sua vez, originam *in vivo*, células gliais e neurônios do sistema nervoso periférico, além de células cromafins do sistema endócrino. Melanócitos são formados por células da CNC e CNT. *In vivo*, as células da CNT não apresentam a capacidade de se diferenciarem em fenótipos mesenquimais. Entretanto, *in vitro*, sob estímulo com fatores químicos e físicos, estas células podem se diferenciar em condrócitos, osteócitos e adipócitos. Frente a estas capacidades que as células da CNT apresentam *in vitro*, avaliamos a utilização de uma matriz sintética e pura chamada PuraMatrix™, para cultivo e diferenciação de células da CNT. Inicialmente, testamos e padronizamos anticorpos para marcação de osteócitos (SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5) em membros posteriores de embriões de codornas. Em seguida, realizamos culturas de células da CNT com embriões de 18-22 pares de somitos, com meio básico de cultivo e com adição de Fatores de Diferenciação Mesenquimais (FDM) para estimular as células a se diferenciarem em adipócitos e osteócitos. Foram testadas as concentrações de PuraMatrix™ 0,15%; 0,25%, 0,5% e 1%. Análises fenotípicas de frequência e quantitativas através da técnica de imunocitoquímica e colorações específicas foram realizadas nos 14º e 21º dias de cultivos para todos os fenótipos da CN. As quatro concentrações de PuraMatrix™ suportaram o cultivo de células da CNT. Entretanto, pelo baixo número de células observado, a concentração de PuraMatrix™ 1% foi descartada de nossas análises. As concentrações de PuraMatrix™ 0,15%; 0,25% e 0,5% possibilitaram a diferenciação de células da CNT para células gliais, neurônios, melanócitos, células musculares lisas e condrócitos, tanto em culturas controles quanto estimuladas com FDM. Adipócitos estiveram presentes nas três concentrações quando estimuladas com FDM, e também nas concentrações de PuraMatrix™ 0,15% e 0,25% na condição controle. Osteócitos foram analisados nas duas concentrações mais baixas de PuraMatrix™, onde marcações para SB-3 ocorreram, mas em co-localização com cartilagem, assim como observado *in vivo*. SB-5 mostrou-se muito específico para osteoblastos/osteócitos e apresentou marcação tanto em cultivos controles quanto tratados. Apenas no 21º dia, houve marcação de alcalina fosfatase

e de matriz mineralizada. PuraMatrix™ abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estudos clonais de progenitores da CN e poderá permitir a identificação de novos progenitores com as potencialidades neurais-mesenquimais para CNT.

**Palavras-chave:** Crista neural truncal. PuraMatrix™. Diferenciação celular.

## ABSTRACT

The neural crest (NC) is composed of heterogenous and multipotent cells, and can be divided into cephalic (CNC) and trunkal (TNC) NC. CNC cells originate, *in vivo*, neural and mesenchymal cells, the last one forming part of the craniofacial skeleton (chondrocytes, osteocytes and odontoblasts) and connective tissue of the face (adipocytes and dermal fibroblasts). The TNC cells, in turn, originated *in vivo*, glial cells and neurons of the peripheral nervous system, in addition to chromaffin cells of the endocrine system. Melanocytes are formed by CNC and TNC cells. *In vivo*, TNC cells don't have the ability to differentiate into mesenchymal phenotypes. However, *in vitro*, under stimulation with chemical and physical factors, these cells can differentiate into chondrocytes, osteocytes and adipocytes. Faced with these capabilities that TNC cells present *in vitro*, we evaluated the use of a pure synthetic matrix called PuraMatrix™, for TNC cell culture and differentiation. Initially, we tested and standardized antibodies for marking osteocytes (SB-1, SB-2, SB-3 and SB-5) on hind limbs of quail embryos. Then, we performed cell cultures of TNC cells with embryos of 18-22 pairs of somites, with basic culture medium and with addition of Mesenchymal Differentiation Factors (MDF) to stimulate the cells to differentiate into adipocytes and osteocytes. The concentrations of PuraMatrix™ 0.15%; 0.25%, 0.5% and 1% were tested. Frequency and quantitative phenotypic analyzes using the immunocytochemistry technique and specific staining were performed on the 14th and 21st day of cultures for all NC phenotypes. The four concentrations of PuraMatrix™ supported the cultivation of CNT cells. However, due to the low number of cells observed, the concentration of PuraMatrix™ 1% was discarded from the analyzes. The concentrations of PuraMatrix™ 0.15%; 0.25% and 0.5% allowed the differentiation of TNC cells into glial cells, neurons, melanocytes, smooth muscle cells and chondrocytes in both control and MDF stimulated cultures. Adipocytes were present in the three concentrations when stimulated with MDF, and also in the concentrations of PuraMatrix™ 0.15% and 0.25% in the control condition. Osteocytes were analyzed for the two lowest concentrations of PuraMatrix™, where SB-3 marker occurred with co-localization with cartilage as well as observed *in vivo*. SB-5 showed to be very specific for osteoblasts/osteocytes and showed labeling in both control and treated cultures. On day 21 only, there was marking of alkaline phosphatase and mineralized matrix. PuraMatrix™ opens new perspectives for the development of clonal studies of NC

progenitors and may allow the identification of new progenitors with the neural-mesenchymal potentialities for TNC.

**Keywords:** Trunk neural crest. PuraMatrix™. Cell differentiation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Divisão, formação e diferenciação da CN.....	27
Figura 2- Método químera galinha-codorna.....	28
Figura 3 - Rotas de migração de células da CN.....	30
Figura 4- Mapa de destino versus potencialidade de células da CN. ....	35
Figura 5- Matriz sintética de PuraMatrix™.....	39
Figura 6- Microscopia de Força Atômica (MFA) de matrizes de PuraMatrix™ nas concentrações de 0,15%, 0,25% e 0,5%.....	40
Figura 7- Comparativo entre as matrizes 3T3 e Matrigel® já utilizadas para o cultivo de células da CN e PuraMatrix™.....	42
Figura 8- Diagrama de comparação dos estágios de linhagens de células osteogênicas in vivo e in vitro e as características fenotípicas.....	47
Figura 9- Esquema representativo da metodologia utilizada para obtenção e cultivo de células da crista neural truncal.....	53
Figura 10- Colorações em membros posteriores de embriões de codornas. ....	55
Figura 11- Marcações de imunohistoquímica indireta para detecção de osteoblastos em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas.....	56
Figura 12 - Marcações de imunohistoquímica indireta para detecção de osteócitos em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas. ....	57
Figura 13- Marcações de imunohistoquímica indireta em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas.....	58
Figura 14- Representação da quantidade de células da CNT totais em 14 dias de cultura.....	59
Figura 15 - Análise de frequência de poços positivos para células gliais em culturas da CNT.....	61
Figura 16- Imagens representativas da diferenciação e morfologia de células gliais.....	62
Figura 17- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células adrenérgicas em culturas da CNT.....	63
Figura 18- Imagens da diferenciação e morfologia de células adrenérgicas.....	65
Figura 19- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células melanocíticas em culturas da CNT.....	66
Figura 20- Imagens da diferenciação e morfologia de células melanocíticas.....	67
Figura 21- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células musculares lisas em culturas da CNT.....	68

Figura 22- Imagens da diferenciação e morfologia de células musculares lisas.....	69
Figura 23- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células adipocíticas em culturas da CNT.....	70
Figura 24- Imagens da diferenciação e morfologia de células adipocíticas. ....	72
Figura 25- Representação gráfica da frequência de poços positivos para condrócitos em culturas da CNT.....	73
Figura 26- Imagens da diferenciação e morfologia de nódulos de condrócitos através de imunocitoquímica para condroitin sulfato.....	74
Figura 27- Imagens da diferenciação e morfologia de nódulos de condrócitos através da coloração por Azul de alcian.....	75
Figura 28- Análise da diferenciação de osteoblastos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15%.....	77
Figura 29- Análise da diferenciação de osteoblastos-osteocíticos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15%.....	78
Figura 30- Análise da diferenciação de osteoblastos-osteocíticos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,25%.....	79
Figura 31- Representação gráfica da frequência de poços positivos para osteoblastos-osteocíticos em culturas da CNT realizadas sobre as concentrações de 0,15 e 0,25% de PuraMatrix™.....	80
Figura 32- Análise da diferenciação osteogênica através da coloração de matriz mineralizada por Vermelho de alizarina em 14 dias.....	81
Figura 33- Análise da diferenciação osteogênica através da expressão de ALP em 14 dias.....	82
Figura 34- Análise da diferenciação de osteócitos através da coloração para Vermelho de alizarina e ALP em culturas de 21 dias em PuraMatrix™ 0,15%.....	83
Figura 35- Representação gráfica da frequência de poços positivos para osteócitos identificados pela coloração de Vermelho de alizarina e ALP em culturas da CNT realizadas sobre a concentração de PuraMatrix™ 0,15%.....	84
Figura 36- Análise de osteócitos por coloração de ALP e condrócitos com Condroitin sulfato em 21 dias de cultura em PuraMatrix 0,15%.....	85
Figura 37- Coloração para ALP e imunocitoquímica para células gliais e células musculares lisas em culturas da CNT controles de 21 dias.....	86
Figura 38- Coloração para ALP e imunocitoquímica para células gliais e células musculares lisas em culturas da CNT tratadas com FDM de 21 dias.....	87
Figura 39- Marcações para SB-3 e SB-5 em 21 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15% tratadas com FDM.....	88



Figura 40- Modelo de segregação de linhagens de células da CNC e CNT  
de aves.....93



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fenótipos celulares diferenciados da CN em espécies de aves e mamíferos.....	32
Tabela 2- Anticorpos primários usados para identificação de células que se diferenciaram na cultura sobre PuraMatrix™.....	51
Tabela 3- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,15%.....	89
Tabela 4- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,25%.....	89
Tabela 5- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,5%.....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D: Bi-dimensional  
3D: Tri-dimensional  
ALP (do inglês): alcalina fosfatase  
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais  
CN: Crista neural  
CNC: Crista neural cefálica  
CNT: Crista neural truncal  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol  
EE: Extrato de embrião  
FDM: Fatores de diferenciação mesenquimais  
GAGs: Glicosaminoglicanos  
HE: Hematoxilina e eosina  
HH: Hamburguer e Hamilton  
HA PHP (do inglês): poliHIPE com hidroxipatita  
HNK1(do inglês): Natural Killer Humano 1  
H-PHP: poliHIPE  
IgG: Imunoglobulina G  
IgM: Imunoglobulina M  
LRD: Lisinato rodamino dextrano  
MEC: Matriz extracelular  
MFA: Microscopia de força atômica  
mg: Miligrama  
ml: Mililitro  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
nm: Nanômetro  
PBS: Tampão fosfato salino  
RADA: argenina-alanina-ácido aspártico-alanina  
SBF: Soro bovino fetal  
TN: Tubo neural  
 $\alpha$ -MEM (do inglês): Meio Alfa Essencial Mínimo  
 $\alpha$ -SMA (do inglês): alfa actina de músculo liso  
 $\beta$ : beta  
%: Por cento  
 $\chi^2$ : qui-quadrado  
 $\leq$ : Menor igual que  
°C: Graus célsius  
 $\mu$ g: Micrograma

$\mu\text{l}$ : Microlitro  
 $\mu\text{m}$ : Micrômetro  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1. CRISTA NEURAL.....	25
1.2. ESPECIFICAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CN .....	29
1.3. MULTIPOTENCIALIDADE E CN .....	33
1.4. MATRIZ EXTRACELULAR E CN .....	36
1.5. HIDROGEL DE PURAMATRIX™ .....	38
<b>2.OBJETIVOS:.....</b>	<b>43</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1. OBTENÇÃO DE EMBRIÕES DE CODORNA PARA IMUNOHISTOQUÍMICA E CULTIVOS CELULARES .....	45
3.2. VALIDAÇÃO DE MARCADORES OSTEOGÊNICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA E COLORAÇÕES ESPECÍFICAS.....	45
3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT.....	48
1.1 CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CNT SOBRE PURAMATRIX™.....	49
3.4. ANÁLISES FENOTÍPICAS .....	50
<b>3.4.1 Imunofluorescência indireta.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.2 Colorações .....</b>	<b>52</b>
3.5. ANÁLISES DE FREQUENCIAS FENOTÍPICAS E ANÁLISES QUANTITATIVA .....	52
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	53

<b>4. RESULTADOS:</b> .....	<b>55</b>
4.1 SB-3 E SB-5 MARCAM OSTEÓCITOS .....	55
4.2 AS QUATRO CONCENTRAÇÕES DE PURAMATRIX™ PERMITEM O CULTIVO DE CÉLULAS DA CNT.....	58
4.3 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PURAMATRIX™ SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT.....	59
4.3.1 Células gliais:.....	60
4.3.2 Células adrenérgicas .....	63
4.3.3 Células melanocíticas .....	65
4.3.4 Células musculares lisas .....	67
4.3.5 Células adipocíticas.....	70
4.3.6 Células condrocíticas .....	72
4.3.7 Células ósseas.....	75
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>105</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>107</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>109</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. CRISTA NEURAL

A Crista Neural (CN) é uma estrutura transitória, formada durante o processo de neurulação de embriões de vertebrados. São células multipotentes e indiferenciadas que migram ao longo do embrião. Foi reconhecida e descrita pela primeira vez pelo embriologista suíço Wilhelm His em 1868, no desenvolvimento de embriões de aves, como uma banda de células que migram entre o tubo neural (TN) dorsal e o epitélio, nomeada por His como “*Zwischenstrang*” – linha intermediária (LE DOUARIN, 2004; HALL, 1999).

Em 1878, Arthur Milnes Marshall, substituiu o termo “linha intermediária” pelo termo “*neural ridge*” (cume neural) em um artigo científico no qual descrevia o desenvolvimento de nervos craniais em embriões de galinha. Um ano depois, percebendo que o termo não descrevia apropriadamente a estrutura, substituiu o termo “*neural ridge*” pelo termo “*neural crest*” - Crista Neural. Marshall descreveu a CN como um “crescimento” de células formado pela fusão longitudinal dos cumes da borda neural depois de formar o TN recoberto pelo epitélio (WESTON; THIERY, 2015). Ironicamente, Marshall viria a falecer tragicamente na queda dos cumes de uma montanha no último dia do ano de 1893 (HALL, 1999).

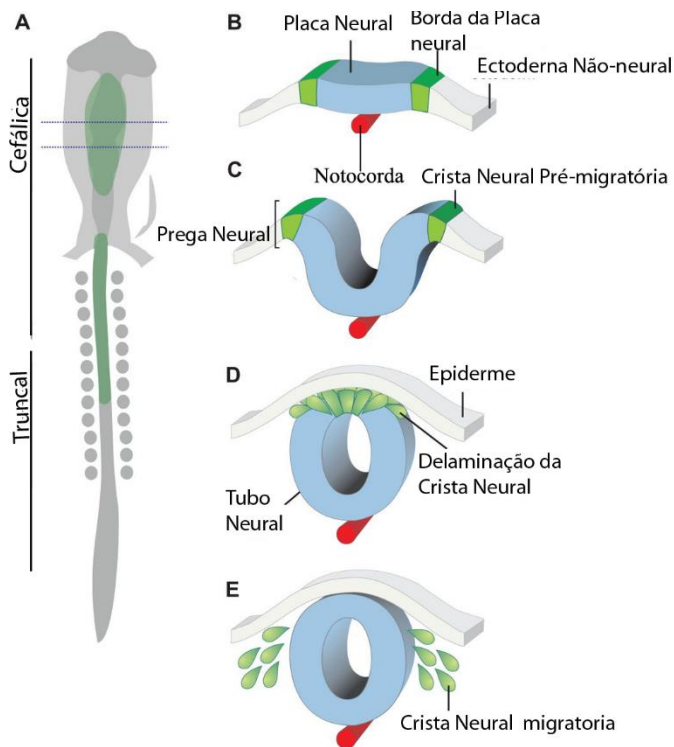
Até este momento a CN estava associada com a origem dos gânglios e neurônios craniais e periféricos. No mesmo ano da morte de Marshall, Julia Platt, utilizando embriões de anfíbios, traz uma proposta revolucionária: a cartilagem crânio facial e os odontoblastos originam-se das células da CN. Platt cunha o termo mesectoderma para distinguir o mesenquima de origem da CN do mesenquima originário do mesoderma (PLATT, 1893). As ideias, muito à frente do tempo, de Platt não tiveram aceitação rápida pela comunidade científica eminentemente masculina da época. Foram necessários mais de 50 anos para que Sven Hörstadius, Sven Sellman e Gavin de Beer revisitassem a questão. Atualmente, a capacidade mesenquimal da CN é bem documentada em todas as classes de vertebrados, ocupando uma posição central nos estudos de desenvolvimento e evolução da esqueletogênese crânio facial (HALL, 1999).

A partir dos anos de 1960 um interesse crescente a respeito da migração das células da CN fez com que as aves passassem a constituir o principal modelo empregado para os estudos. Os trabalhos pioneiros de Weston (1963) e Mac Johnston (1966) relacionados a migração das

células da CN da região cefálica e da região do tronco foram coroados pelo modelo de quimeras galinha-codorna desenvolvido por Nicole Le Douarin (1969) (HALL, 1999).

De maneira simplificada, podemos dividir a CN em Cefálica (CNC), a população de células da CN que migram da região correspondente ao mesencéfalo até o quarto par de somitos, e CN Truncal (CNT), que corresponde as células da CN que migram a partir da região correspondente ao quarto par de somitos até ao último (Figura 1A) (COULY *et al.*, 1996; KÖNTGES ; LUMSDEN, 1996).

Figura 1- Divisão, formação e diferenciação da CN.

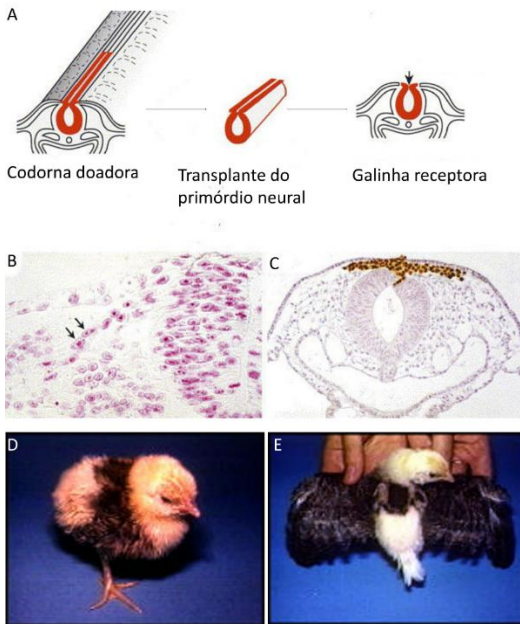


(A) Vista dorsal esquemática de um embrião de galinha, mostrando a CN (verde). As linhas pontilhadas delimitam a região embrionária representada em secção transversal (B-E); (B) o desenvolvimento da CN começa no estágio de gástrula, com a especificação de fronteiras nas bordas da placa neural; (C) a medida que a placa neural se fecha para formar o tubo neural, os progenitores da CN são especificados na parte dorsal das pregas neurais; (D) após especificação, as células da CN passam por uma transição epitélio-mesenquimal e delaminam a partir do tubo neural; (E) células da CN migram para diversos destinos, onde vão dar origem a diversos tipos celulares distintos. Modificado de SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015.

Como já mencionado anteriormente, em 1969, Nicole Le Douarin empregou uma técnica simples, baseada na observação de núcleos de células de galinhas e codornas, para rastrear e estudar as células da CN. As células de codornas apresentam um nucléolo heterocromático, apresentando uma coloração mais forte que a das células de galinha quando corados com Feulgen-Rossenbeck. Le Douarin observou que esta

diferença continuava presente durante todo o processo de desenvolvimento embrionário. Então, uma região específica do TN do embrião de codorna foi substituída por um TN de galinha em estágio equivalente, formando um sistema de quimeras codorna-galinha (Figura 2). As células da CN de codornas migraram nos embriões de galinha hospedeiros do transplante e deste modo, tornou-se possível acompanhar a migração e destino das células da CN (LE DOUARIN, 1969).

Figura 2- Método quimera galinha-codorna.



(A) Tubo neural de um embrião de codorna transplantado no lugar de um tubo neural de galinha em estágio de desenvolvimento equivalente; (B) imagem de um corte histológico corado com o corante de núcleo Feulgen Rossenbeck evidenciando células da CN (indicadas pelas setas pretas) migrando de um enxerto de tubo neural de codorna ao nível do tronco; (C) imagem de um corte histológico para detecção de células da CN de codornas através de reação imunocitoquímica (em marrom na figura). Para detecção das células da CN foi utilizado um anticorpo monoclonal criado contra um antígeno nuclear de codorna. Observar o tecido adjacente da galinha que foi receptor para o transplante de células da CN que migram unilateralmente a partir da região dorsal do tubo neural; (D e E) Quimeras galinha-codorna, mostrando as asas

pigmentadas de galinhas albinas como resultado da contribuição dos melanócitos derivados da CN das codornas. Modificado de LE DOUARIN, 2004.

Hoje, sabe-se que a CN é composta por células que migram ao longo do eixo rostro-caudal do embrião e irão colonizar e participar na formação de estruturas tão distintas como a face e o sistema nervoso periférico (LE DOUARIN; TEILLET, 1973). Estas células, que inicialmente são indiferenciadas e multipotentes, originam diversos tipos celulares devido à influência do microambiente encontrado pelas mesmas durante o processo de migração e no local de destino final de diferenciação (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Desta forma, fatores extrínsecos (matriz extracelular, fatores de crescimento, etc.) e fatores intrínsecos (receptores, programa genético, epigenético, etc) regulam a sua diferenciação. Um equilíbrio entre ambos é necessário para que estas células adotem uma determinada identidade (fenótipo) (DONOGHUE; GRAHAM; KELSH, 2008).

## 1.2. ESPECIFICAÇÃO, MIGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CN

A especificação da CN é induzida pela expressão de fatores de transcrição de expressão cumulativa, denominados especificadores da CN. Estão presentes em células pré-migratórias e recém migradas e alguns mantêm-se durante toda a migração e mesmo após a diferenciação (como Sox10 e AP-2). Outros genes, como FoxD3 e Pax3, estão presentes apenas no processo de especificação e na transição epitélio-mesenquimal que as células da CN sofrem antes de delaminarem e migrarem ao longo do embrião (como Snail2) (BETANCUR; BRONNER-FRASER; SAKURA-SPENGLER, 2010).

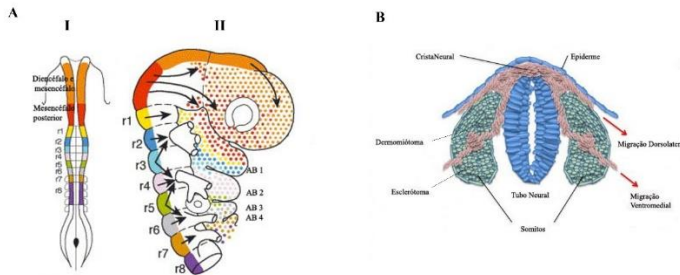
Após especificadas, as células da CN irão migrar. Para isso, elas passam pela transição epitélio-mesenquimal e delaminam. Para que isso ocorra, genes são ativados ou reprimidos (como Snail e E-caderina), permitindo que as células se tornem menos compactas e adquiram motilidade. As alterações ocorrem a nível celular, e incluem mudanças nas junções celulares, propriedades de adesão e reorganização do citoesqueleto (BETANCUR; BRONNER-FRASER; SAUKA-SPENGLER, 2010).

A migração da CNC é essencialmente subectodermal e irá gerar parte do esqueleto cranial e facial (Figura 3A I e II). As células irão migrar para a região frontal e lateral através dos arcos branquiais e originarão as estruturas maxilares e mandibulares (COULY *et al.*, 1996; KÖNTGES;

LUMSDEN, 1996). As células que migram a partir dos últimos rombômeros possuem migração dorso-ventral e seguem em direção a faringe e ao tubo digestivo anterior, gerando o sistema nervoso entérico. Outras células, também provenientes dos últimos rombômeros, irão migrar ao longo dos arcos aórticos, formando parte do trato cardíaco (LE DOUARIN; TEILLET, 1973; LE LIÈVRE; LE DOUARIN, 1975; ETCHEVERS *et al.*, 2001).

A migração da CNT acontece em duas rotas principais. A migração ventromedial ocorre primeiro e as células penetram entre a formação do dermomiótoma e esclerotoma formando o sistema nervoso periférico e células do sistema endócrino (RICKMANN; FAWCETT; KEYNES, 1985; LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Na migração dorsolateral, as células migram entre o ectoderma e os somitos, dispersando-se sob o ectoderma e originando os melanócitos da pele (Figura 3B) (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

Figura 3 - Rotas de migração de células da CN.



(A) I. Vista dorsal de um embrião e II. Vista lateral de um embrião. As flechas indicam as rotas de migração de células da CN céfalica. Os pontilhados representam as células da CN que migraram, e as cores são correspondentes ao local de onde migraram. r: rombômero, AB: arco branquial. (Fonte: Modificado de LE DOUARIN, 2004); (B) migração da CNT, onde a rota ventromedial das células da CN passam entre o dermomiótoma e esclerótoma e rota dorsolateral, em que as células migram entre o ectoderma e os somitos (Fonte: Modificado de RUGGERI *et al.*, 2013).

Os progenitores multipotentes que migram a partir da CNC originam, *in vivo*, células mesenquimais formando parte do esqueleto craniofacial (condrócitos, osteócitos e odontoblastos), bem como o tecido conjuntivo da face (adipócitos e fibroblastos dermais) (Tabela 1) (COULY *et al.*, 1996).

As células da CNT, por sua vez, originam *in vivo*, células gliais e neurônios do sistema nervoso periférico, além de células cromafins do sistema endócrino. Células pigmentares são formadas ao longo de todo o eixo rostro-caudal (Tabela 1) (TEILLET , KALCHEIN, 1987; SERBEDZIJA; FRASER; BRONNER-FRASER, 1990; LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; KASEMEIER-KULESA; KULESA; LEFCORT, 2005).

Tabela 1- Fenótipos celulares diferenciados da CN em espécies de aves e mamíferos.

	FENÓTIPOS CELULARES DERIVADOS DA CN				
	NEURÔNIOS CÉLULAS GLIAIS	E	CÉLULAS PIGMENTARES	CÉLULAS ENDÓCRINAS	CÉLULAS MESENQUIMAIS
Cefálica	Neurônios SNP Gânglios sensoriais craniais, gânglios entéricos e parassimpáticos Células gliais satélites no gânglio do SNP Células de Schwann Células gliais olfatórias		Melanócitos da pele Células pigmentares do ouvido interno	Células da carótida Células C (tireóide)	Osteócitos e condrócitos craniofaciais Células musculares lisas Pericitos Odontoblastos Adipócitos Células dermais Células da córnea (endotélio e estroma)
Truncal	Neurônios SNP		Melanócitos da pele	Células da medula adrenal	Fibroblastos endoneurais (nervo ciático de camundongos)
Gânglio sensorial (GRD), gânglio simpático e parassimpático	Células gliais satélites no gânglio do SNP Células de Schwann				

Fonte: Modificado de DUPIN; COELHO-AGUIAR, 2013



Pelo exposto acima, fica claro que as células da CNC apresentam *in vivo* um potencial de diferenciação maior que as células da CNT. Apenas a CNC *in vivo*, origina derivados mesectodermiais –condrócitos, osteócitos e adipócitos- como cunhado por Julia Platt em 1893. Contudo, *in vitro* as células da CNT também apresentam esta capacidade quando estimuladas corretamente.

### 1.3. MULTIPOTENCIALIDADE E CN

Muitos trabalhos tentaram elucidar a potencialidade de células da CN, com o objetivo de desvendar se as células progenitoras são multipotentes ou comprometidas a um fenótipo (pré-determinadas). Bronner-Fraser e Fraser (1988) marcaram por microinjeção com corante lisinato rodâmico dextrano (LRD) células do TN dorsal de aves para acompanhar seus descendentes durante a migração e diferenciação (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988). Neste trabalho foi observado que descendentes de uma única célula diferenciaram-se em até quatro fenótipos distintos da CN. Foi observado ainda que 60% dos clones que originaram células da CN distribuíram-se em vários lugares do embrião e deram origem a distintos tipos celulares, indicando precursores multipotentes (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988). Entretanto, estes resultados não descartaram também a presença de células pré-determinadas na CN pré-migratória (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988).

Contrapondo este estudo, Krispin e colaboradores sugerem que as células da CN tornam-se especificadas antes da migração, colonizando estruturas individuais e diferenciando-se em um único fenótipo em seu lugar de destino. Ainda, células da CN forçadas a migrarem ectopicamente mantem sua identidade de originar derivados neurais nos gânglios, sustentando a ideia de que as células da CN tornam-se comprometidas quanto ao seu destino ainda no TN dorsal (KRISPIN *et al.*, 2010). Contudo, esses experimentos também não descartaram que existam células progenitoras multipotentes, ou a plasticidade das células progenitoras restritas (KRISPIN *et al.*, 2010).

Os dois estudos citados acima, diferem nas fases de desenvolvimento e níveis analisados do eixo do embrião. Bronner-Fraser e Fraser analisaram embriões entre níveis em que os embriões variam os números de somitos entre 8-28 e 12-25, podendo ter marcado progenitores neuroectodérmicos primitivos, onde não ocorreu ainda a segregação entre TN e CN ou o comprometimento das células para os vários destinos da CN. Assim, estas células marcadas proliferaram dentro

do neuroepitélio antes de migrarem e adquirirem restrição de destino (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988; KRISPIN *et al.*, 2010). Por outro lado, Krispin e colaboradores utilizaram embriões mais velhos, de 20-25 somitos utilizando o flanco, e em embriões de menos de 20 somitos foi utilizado flanco prospectivo, tornando mais difícil a possibilidade de erro.

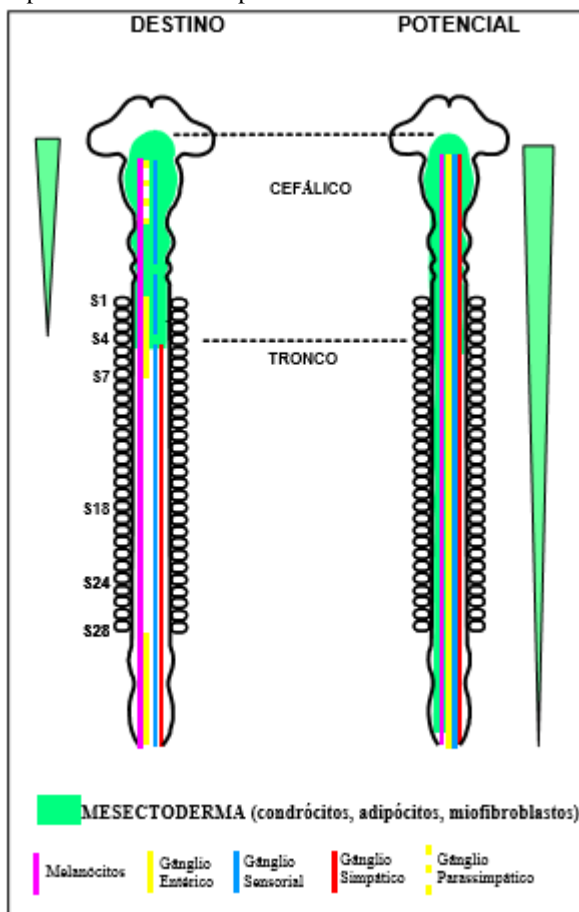
Recentemente, Baggiolini e colaboradores demonstraram em embriões de ratos, através da técnica “*confetti*”-ratos transgênicos que especificamente marcam células da CN com até dez cores distintas, permitindo o rastreamento destas células e sua progênie-, que a vasta maioria de precursores individuais da CN são multipotentes. Deste modo, muitos clones foram capazes de gerar progenies que contribuíram para uma combinação de lugares, diferenciando-se para células neuronais e gliais no ganglio da raiz dorsal e ganglio simpático. Outros clones tiveram a capacidade de diferenciação em neurônios, glias e melanócitos ao longo do caminho dorsolateral. Assim, tanto precursores pré-migratórios como recém migrados do TN, tem a capacidade de popular distintas estruturas e contribuir para diversos tipos celulares (BAGGIOLINI *et al.*, 2015). Entretanto, esta análise clonal *in vivo* mede apenas o “limite inferior” do potencial da célula inicial precursora da CN. O potencial de multipotencialidade total de uma célula da CN somente pode ser testado expondo o mesmo progenitor a diferentes ambientes. Deste modo, não podemos presumir que um progenitor unipotente seja restrito apenas a esse destino (BRONNER, 2015).

Uma maneira de estudar a potencialidade de uma célula progenitora da CN é por clonagem *in vitro*. Nesta técnica, apenas uma célula é colocada para proliferar e diferenciar em meios e/ou ambientes propícios. Estas células são isoladas do embrião depois que migram a partir do explante de TN (LE DOUARIN, 2004). Desta maneira, cria-se um modelo hierárquico de potencialidade e segregação de progenitores da CN.

Além disso, culturas em massa de células da CN (em geral 400 células por poço) em ambientes propícios, também nos mostram as capacidades latentes que estas células apresentam. Deste modo, células da CNT quando colocadas em um ambiente propício, *in vitro*, também podem originar derivados mesenquimais (MC GONELL; GRAHAM, 2002; CALLONI *et al.*, 2007, COELHO-AGUIAR; LE DUARIN; DUPIN, 2013). Assim, a potencialidade exibida *in vitro* pelas células da CNT não é totalmente sobreponível com o destino de diferenciação

adotado *in vivo* pelas mesmas (LE DOUARIN; CALLONI; DUPIN, 2008) (Figura 4).

Figura 4- Mapa de destino versus potencialidade de células da CN.



Diferenciação dos progenitores da CN *in vivo* (esquerda) e potencialidade que estes progenitores podem apresentar (direita). Células melanocíticas são formadas ao longo de todo o embrião (o mesmo vale para a potencialidade que estas células apresentam). Por outro lado, apenas algumas regiões da CN originam gânglio entérico, sensorial, simpático e parassimpático *in vivo* (esquerda). Entretanto, esse potencial está presente ao longo de todo o eixo embrionário. O mesmo equivale para derivados mesectodermiais, onde *in vivo* apenas a região cefálica origina estes fenótipos, mas esta potencialidade de

diferenciação está presente ao longo de todo o eixo do embrião. Fonte: Modificado de LE DUARIN; KELCHEIM, 1999.

Para uma melhor compreensão das potencialidades exibidas pelas células da CN, tornou-se necessário a utilização de substratos (matrizes) que permitam e/ou promovam a diferenciação destas células na maior gama possível de derivados (fenótipos) *in vitro*. Entretanto, poucos estudos até o momento dedicaram-se à compreensão da influência de diferentes matrizes naturais e sintéticas no estudo da plena potencialidade de células da CNT.

#### 1.4. MATRIZ EXTRACELULAR E CN

Ao longo dos anos, não apenas fatores de crescimento, receptores e fatores de transcrição mostraram-se suficientes ou únicos como reguladores da migração e diferenciação de células da CN, mas também moléculas da matriz extracelular (MEC) foram identificados como importantes reguladores da migração e diferenciação de células da CN (CHRISTIANSEN; COLES; WILKINSON, 2000).

A organização da topografia e a expressão de componentes da MEC são conservados ao longo da evolução e podem estar envolvidos na migração e diferenciação das células da CN (PERRIS, 1997). Os constituintes de MEC podem ser divididos arbitrariamente em (1) moléculas permissivas - que permitem a motilidade das células e estão amplamente expressas ao longo do trajeto de migração de células da CN, como fibronectinas, lamininas, colágenos tipo I, IV e VI; (2) moléculas não permissivas - moléculas ineficazes ao permitir a motilidade celular e escassas ou totalmente ausentes das vias migratórias, como tenascinas, colágeno tipo II e III; e (3) moléculas inibidoras - que impedem direta ou indiretamente a migração celular e que são restritas às áreas não permissivas para a migração, como o proteoglicano agregam e o glicosaminoglicano condroitin sulfato (PERRIS, 1997).

Neste sentido, a maior parte dos estudos de diferenciação e multipotencialidade das células da CN tem usado matrizes extracelulares isoladas (i.e. colágeno, fibronectina, laminina, etc) e também monocamadas de fibroblastos embrionários de camundongos (3T3) (CALLONI *et al.*, 2007; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; COELHO-AGUIAR; LE DUARIN; DUPIN, 2013). Em ambos os casos, estes substratos são bidimensionais (2D) não refletindo a complexidade do ambiente tridimensional (3D) encontrado pelas células da CN *in vivo*.

Os estudos realizados com as monocamadas de células 3T3 foram muito importantes para o avanço dos conhecimentos relacionados ao processo de diferenciação das células da CN. A utilização destas monocamadas permitiu que a CN expressasse sua plena potencialidade. A partir de estudos clonais da CN sobre o 3T3, está claro atualmente que a CN é composta em sua grande maioria por progenitores altamente multipotentes *in vitro* e uma minoria de progenitores unipotentes, já comprometidos desde sua migração a partir do tubo neural com um destino determinado de diferenciação (CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI; LE DUARIN; DUPIN, 2009). Importante salientar que mais de 90% destes progenitores exibem potencialidades neurais e mesenquimais concomitantemente (CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI; LE DUARIN; DUPIN, 2009).

A eficiência das monocamadas de 3T3 em permitir a diferenciação desta ampla gama de derivados a partir de células indiferenciadas da CN pode ser explicada pela riqueza dos fatores de crescimento e moléculas da MEC presentes no microambiente criado pelo 3T3. Contudo, esta monocamada prejudica a distinção entre as células da CN e os fibroblastos, dificultando estudos mais complexos, tais como experimentos de sub-clonagens (retirada das células da CN das monocamadas para posterior sub-cultivo). Além disso, não se sabe quais fatores secretados por estas células, bem como as concentrações dos mesmos, estariam atuando direta ou indiretamente, de maneira sinérgica ou não, sobre a diferenciação final dos diferentes tipos celulares gerados.

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa, analisou a diferenciação das células da CNT sobre uma mistura de proteínas e moléculas da MEC extraídos de sarcomas de ratos. Este material é comercialmente e comumente denominado de Matrigel®. Este estudo foi muito importante na evolução dos estudos da potencialidade das células da CN, uma vez que permitiu a obtenção concomitante de uma grande variedade de fenótipos neurais e mesenquimais (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013).

Importante salientar que neste estudo foi observado um grande incremento na frequência do aparecimento de nódulos de cartilagem a partir de células da CNT em relação a estudos anteriores (MC GONELL; GRAHAM, 2002; CALLONI *et al.*, 2007). Este avanço pode ser explicado tanto pelos fatores químicos presentes no Matrigel®, mas sobretudo pela possibilidade da formação de um arcabouço tridimensional (3D), o qual é mais compatível com o complexo ambiente encontrado *in vivo* por estas células (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). Contudo, encontramos com o Matrigel® uma mesma problemática observada na utilização das

monocamadas de 3T3: o não conhecimento de todas as moléculas, bem como suas concentrações presentes nesta matriz. Além disso, o Matrigel® conta com certa variabilidade lote a lote. Um problema que pode ser contornado com a mistura de vários lotes diferentes, entretanto, encarece e dificulta metodologicamente sua utilização.

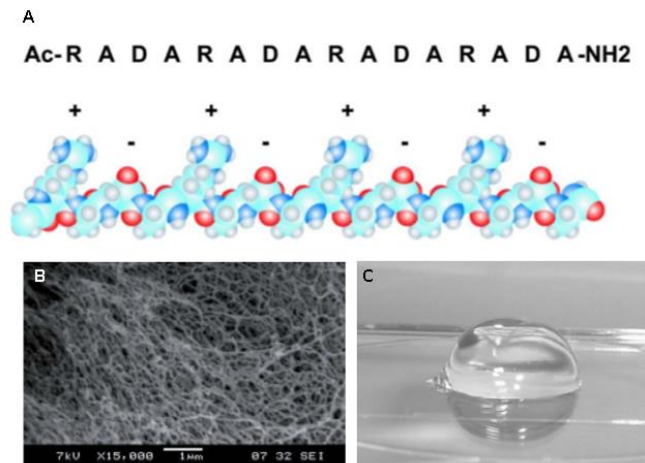
Pelo exposto acima, podemos observar que o uso de arcabouços formando microambientes bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) são vitais para o estudo das capacidades de diferenciação das células da CN. Para a sobrevivência, manutenção e diferenciação das células da CN os meios de cultivo empregados devem apresentar vários e complexos nutrientes encontrados no soro bovino fetal e no extrato de embrião classicamente empregados. Neste sentido a utilização de monocamadas alimentadoras de 3T3 e Matrigel® apenas deixam o cenário mais complexo e dificultam ainda mais os estudos dos mecanismos de tomada de destino e diferenciação adotados por progenitores multipotentes da CN. Neste sentido, o principal objetivo deste trabalho foi buscar uma matriz que ao mesmo tempo permitisse a plena expressão das potencialidades da CN e reduzisse ao menos parcialmente a complexidade no cenário de moléculas envolvidas neste processo.

### 1.5. HIDROGEL DE PURAMATRIX™

PuraMatrix™ é um peptídeo sintético de 16 aminoácidos, formado pela repetição dos peptídeos arginina-alanina-ácido aspártico-alanina, também descrito como (RADA)<sub>4</sub> ou RAD16-I (TAKEI, 2006). Sua sequência é AcN-(RADA)<sub>4</sub>-CNH<sub>2</sub>, alternando aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Figura 5A) (ZHANG *et al.*, 1995).

É um peptídeo de extrema pureza, livre de matéria animal e usado como arcabouço 3D para o cultivo de células. Este polímero é constituído por uma mistura de aminoácidos padrões (1% w/v) e 99% de água. Em condições fisiológicas estes componentes peptídicos do polímero se autoassociam em um hidrogel formando uma estrutura tridimensional (BD Biosciences Discovery Labware, 2014) (Figura 5B e C).

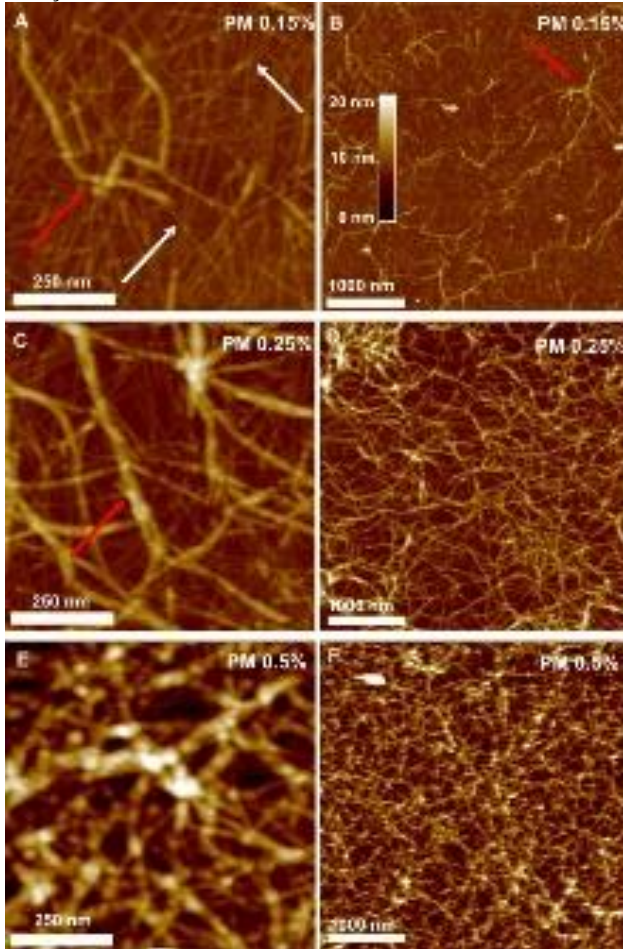
Figura 5- Matriz sintética de PuraMatrix™.



(A) Modelo molecular de PuraMatrix™ em cadeia de conformação  $\beta$ ; (B) microscopia eletrônica de varredura da matriz de PuraMatrix™ autoassociada; (C) PuraMatrix™ 1% colocado em uma superfície de plástico e gelificado com solução de PBS 1x. Fonte: Modificado de TAKEI, 2006.

O tamanho das fibras é de 7-10 nm de diâmetro, muito similar à MEC natural, onde o tamanho das fibras é de 5-10 nm de diâmetro, e o tamanho médio dos poros é de 50-400 nm, onde este varia de acordo com sua concentração em água. Sua utilização como uma matriz 3D aproxima-se do microambiente encontrado pelas células durante a migração, proliferação e diferenciação, e, também possibilita a sinalização para estas funções críticas da célula (ZHANG; ZHAO; SPIRIO, 2005). Ainda, o tamanho médio dos poros e densidade das fibras pode variar de acordo com a concentração do polímero (Figura 6).

Figura 6- Microscopia de Força Atômica (MFA) de matrizes de PuraMatrix™ nas concentrações de 0,15%, 0,25% e 0,5%.



Imagens de MFA para as concentrações de PuraMatrix™ 0,15% (A e B), PuraMatrix™ 0,25% (C e D) e PuraMatrix™ 0,5% (E e F). As concentrações mais baixas de PuraMatrix™ (PM 0,15% e 0,25%) mostram uma distribuição homogênea de fibras e feixes de PM simples, enquanto que um aumento na concentração de PuraMatrix™ eleva o número de feixes dentro da rede. Na concentração de 0,5% as fibras formam redes muito densas que não podem ser penetradas pelo feixe do microscópio. Flechas brancas indicam folhas  $\beta$  finas e longas e flechas vermelhas indicam agregados de folhas  $\beta$ . Fonte: ORTINAU *et al.*, 2010.



Como matriz para estudo *in vitro*, o PuraMatrix™ não apresenta citotoxicidade ou problemas com biocompatibilidade, é estável e compatível com soluções fisiológicas e possibilita a análise por microscopia e biologia molecular (ZHANG; ZHAO; SPIRIO, 2005). Por estes motivos, torna-se viável a utilização de culturas de hepatócitos nesta matriz para estudos de citotoxicidade de moléculas, como por exemplo em estudos de medicamentos, podendo substituir experimentos em animais (TAKEI, 2006).


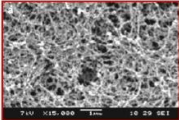
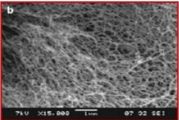
Atualmente, o PuraMatrix™ é utilizado para encapsulação de células, entrega de medicamentos, na medicina regenerativa, controle de sangramentos e culturas celulares (ZHANG; ZHAO; SPIRIO, 2005; MORADI *et al.*, 2012; BD *Biosciences Discovery Labware*, 2014). Na engenharia de tecidos, foi mostrado que PuraMatrix™ permitiu a fixação e diferenciação neuronal de células do cerebelo e hipocampo, bem como a formação de sinapses funcionais entre neurônios e anexos. Quando injetado em camundongos, não resultou em nenhuma reação imune ou inflamatória (HOLMES *et al.*, 2000). Ainda nesta área, foi testado se PuraMatrix™ -e outras matrizes- suportaria a formação de redes microvasculares por células progenitoras endoteliais e mesenquimais em ratos de sete dias com imunodeficiência e PuraMatrix™ mostrou resultados significativamente maiores para a formação de vasos, quando comparado às outras matrizes (ALLEN; MELERO-MARTIN, 2011).

Yamaoka e colaboradores demonstraram que condrócitos cultivados em PuraMatrix™ produzem mais matriz em comparação ao cultivo de condrócitos em um ambiente 2D (YAMAOKA *et al.*, 2006). Para o cultivo de osteoblastos, o objetivo era investigar a proliferação, diferenciação e mineralização da matriz em culturas de células cultivadas na combinação de dois biomateriais – PuraMatrix™ e poliHIPE com hidroxiapatita (HA PHP) e PuraMatrix™ e poliHIPE sem hidroxiapatita (H-PHP). Em ambos os casos PuraMatrix™ foi bem incorporado por PHP, e os osteoblastos observados formaram camadas multicelulares na superfície do biomaterial e também dentro dos biomateriais. Neste último caso, o biomaterial agiu como um arcabúço, onde as células penetraram em uma profundidade máxima de 3 mm após 35 dias de cultura. Ainda, a utilização conjunta desses dois biomateriais apresentou melhores resultados quando comparado apenas à utilização de PHP (BOKHARI *et al.*, 2005).

Em função das características descritas na figura abaixo, das diferentes matrizes já utilizadas para o cultivo de células da CN, PuraMatrix™ mostra-se uma boa alternativa para o cultivo de células da

CN, permitindo um controle sobre a influencia do meio extracelular sobre a proliferação e diferenciação celular.

Figura 7- Comparativo entre as matrizes 3T3 e Matrigel® já utilizadas para o cultivo de células da CN e PuraMatrix™.

<b>3T3</b>	<b>Matrigel®</b>	<b>PuraMatrix™</b>
		
Fonte: Produzida pelo autor	Fonte: BD Biosciences	Fonte: BD Biosciences
<ul style="list-style-type: none"><li>• Células vivas;</li><li>• Secretam fatores ao meio;</li><li>• Não permite subclonagem.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• MEC;</li><li>• Muitos fatores no meio;</li><li>• Permite subclonagem.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sintético;</li><li>• Puro;</li><li>• Permite subclonagem.</li></ul>

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a diferenciação de células da CN sobre uma matriz sintética constituída por PuraMatrix™ como alternativa para o cultivo de células da CNT de aves.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar marcadores para osteócitos para células da CN;
- Avaliar diferentes concentrações de PuraMatrix™ como arcabouços para cultura de células da CNT;
- Analisar qualitativamente e quantitativamente os fenótipos diferenciados a partir de progenitores da CNT cultivados em diferentes concentrações de PuraMatrix™;
- Verificar o efeito de Fatores de Diferenciação Mesenquimal sobre a diferenciação de células da CNT cultivadas sobre PuraMatrix™.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO DE EMBRIÕES DE CODORNA PARA IMUNOHISTOQUÍMICA E CULTIVOS CELULARES

Este trabalho foi realizado com embriões de codorna (*Cotunix cotunix japonica*) nos estágios de desenvolvimento de 35 HH (HAMBURGUER; HAMILTON, 1951) para análise imunohistoquímica dos membros posteriores e de 12-14 HH (18 a 22 somitos) para os cultivos das células da crista neural (CN). Os ovos fertilizados foram obtidos de uma granja particular localizada em Rio do Sul - SC. Estes ovos foram mantidos em incubadora por sete dias para a obtenção de membros posteriores e por 46 horas para obtenção das células da CN, à 38° C com umidade relativa de 72%.

Os procedimentos estão devidamente aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo de número PP00787.

#### 3.2. VALIDAÇÃO DE MARCADORES OSTEOGÊNICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA E COLORAÇÕES ESPECÍFICAS

Inicialmente, foram isolados membros posteriores de embriões de codornas no estágio 35 HH para localização histológica dos centros de ossificação dos membros posteriores. Na sequência osteoblastos e osteócitos foram detectados nestes cortes histológicos através de colorações específicas e de anticorpos específicos através da técnica de imunohistoquímica. Os membros foram inicialmente lavados em PBS 1x (tampão fosfato salino diluído em 1x) e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas à 4°C. Em seguida, o material foi desidratado em temperatura ambiente, passando por concentrações crescentes de etanol: 70% por 1 hora e 30 minutos; 90% por 30 minutos; 100% por 30 minutos e finalmente um segundo banho de álcool 100% por mais 30 minutos. Em seguida, o material passou por diafanização, permanecendo 1 hora em Xilol, onde este foi trocado aos 30 minutos. Para a inclusão em parafina, realizada à 60°C, o material ficou imerso em parafina por 2 horas, com troca de parafina em 1 hora, e em seguida permaneceu *overnight* em uma nova parafina. Para a montagem dos blocos de parafina, foi utilizado o Emblocador de amostras Leica® EG1150H. Para a preparação das

lâminas, os blocos de parafina foram cortados em uma espessura de 5 µm no Microtomo Leica® RM2255.

Para a coloração das lâminas, estas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas por 5 minutos em soluções decrescentes de etanol (100%, 90%, 70%) e lavadas em água destilada. As lâminas foram coradas com o corante Hematoxilina-Eosina (HE) para a localização da estrutura a ser analisada e com Vermelho de alizarina para marcação de regiões de mineralização óssea. Para a marcação de fosfatase alcalina (ALP) – secretado por células ósseas e encontrada na matriz celular- foi utilizado o kit 85L2 da Sigma®.

Para a coloração de HE, as lâminas ficaram 30 minutos cobertas de hematoxilina, foram lavadas em água destilada por 3 minutos e em seguida permaneceram por 10 minutos em eosina, e, em seguida, lavadas por 3 minutos em água destilada. Para a identificação de osteócitos, as lâminas permaneceram por 10 minutos cobertas com vermelho de alizarina 2% (Sigma®) para marcação de matriz mineralizada, e para a coloração de ALP, foi adicionado 150 µl da solução de coloração para ALP na lâmina, onde permaneceu por 30 minutos sem exposição à luz. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada.

Para o preparo da solução de coloração de ALP, foi adicionado uma cápsula de *Fast blue RR salt* em 48 ml de água destilada em temperatura ambiente. Após a completa diluição, foi adicionado à solução 2 ml da solução alcalina de naftol AS-MX.

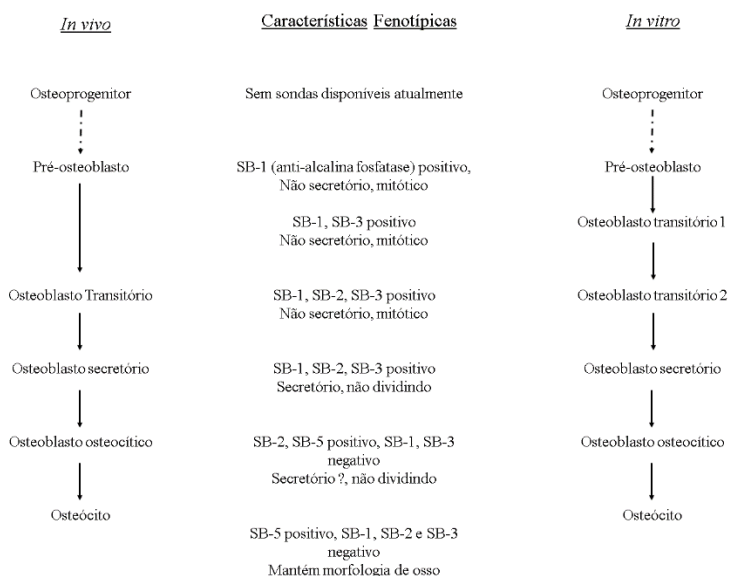
Todas as lâminas foram desidratadas passando por concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%, 5 minutos cada). Em seguida as lâminas foram diafanizadas por 5 minutos em xilol e receberam lamínulas coladas com Entellan®. Após as colorações, as lâminas foram analisadas e fotografadas ao microscópio de epifluorescência Olympus BX 41.

Para detectar o fenótipo osteoblástico através de reações de imunohistoquímica testamos uma série de anticorpos monoclonais desenvolvidos por Arnold Caplan entre as décadas de 80 e 90 na Universidade de Case Western, USA. O Dr. Caplan generosamente doou algumas alíquotas deste anticorpo para nosso grupo de pesquisa. Para produzir estes anticorpos, camundongos foram imunizados com uma população heterogênea de células ósseas de embriões de galinha, e seus esplenócitos foram fusionados com células de mielomas - formando hibridomas - que foram cultivados e expandidos. Quatro linhagens celulares, SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5, que secretavam diferentes anticorpos monoclonais foram sucessivamente clonados, estabilizados e imortalizados (BRUDER; CAPLAN, 1989).

O anticorpo SB-1 foi determinado ser IgG-2b; o anticorpo SB-2 é IgM, SB-3 é IgG-1 e SB-5 é IgG-2b.

Como os anticorpos datavam de mais de 20 anos e não haviam sido utilizados pelo grupo do Dr. Caplan nos últimos anos, resolvemos testá-los no modelo *in vivo* antes de proceder às análises *in vitro* de nosso modelo de estudos. Na série de estudos realizados pelo Dr. Caplan e seu grupo, os anticorpos foram utilizados para identificar a diferenciação óssea em cortes histológicos de tíbias de galinhas e codornas em diferentes estágios de desenvolvimento (28 HH, 29-30 HH, 32HH, 34-35HH e 36HH). Assim, de acordo com as marcações combinatórias e morfologias celulares, foi proposto o seguinte diagrama:

Figura 8- Diagrama de comparação dos estágios de linhagens de células osteogênicas *in vivo* e *in vitro* e as características fenotípicas.



Fonte: Adaptado de BRUDER; CAPLAN, 1989.

Deste modo, para controle das marcações para células ósseas em nosso modelo de estudo, foram realizadas reações imunohistoquímicas com os marcadores SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5 em cortes histológicos de

membros posteriores de embriões de codornas no estágio 35 HH, conforme protocolo realizado por Bruder e Caplan (1989). Após retirados os membros posteriores, estes foram lavados em PBS 1x com 5% de sacarose, colocados em Tissue-Tek® (Sakura®) e congelados em refrigerador. Estes blocos foram cortados numa espessura de 10 µm em criostato em uma temperatura de -20° C.

As lâminas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Vitrocell®) para bloquear os sítios inespecíficos. As lâminas permaneceram *overnight* a 4°C em câmara úmida com 200 µl dos meios condicionados de SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com PBS 1x para retirada dos anticorpos que não se ligaram aos epítomos.

Após a marcação com os anticorpos primários, as lâminas foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 200 µl de anticorpos secundários específicos (Alexa 594® e Alexa 488® dos isotipos IgG-1; IgG-2b e IgM, Invitrogen®) na concentração de 1:100 diluídos em PBS 1x. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS 1x. Paralelamente, em algumas destas mesmas lâminas foram realizadas reações de imunohistoquímica para detecção de condroitin sulfato, um glicosaminoglicano altamente expresso em cartilagens. Para isso foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-condroitin sulfato (clone CS 56 Sigma®) na diluição de 1:1000 empregando o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os núcleos foram corados com corante fluorescente nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol – DAPI (1 mg/ml; Sigma®) diluído em PBS 1x (1:1000) por 5 minutos.

### 3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT

As células da CNT foram obtidas de explantes de tubos neurais dissecados da região truncal correspondente aos últimos 10 pares de somitos de embriões de codorna em estágios de desenvolvimento entre 18 a 22 pares de somitos (12-14 HH). Os tecidos circundantes aos tubos neurais foram retirados na presença de pancreatina diluída em Meio Essencial Mínimo Modificado ( $\alpha$ -MEM, Gibco®), em uma proporção de 1:3 em meio  $\alpha$ -MEM. Para este procedimento microcirúrgico foi necessário o auxílio de um microscópio estereoscópico (Optika®) e de agulhas entomológicas de tungstênio. Depois de dissecados, os explantes de tubo neural foram retirados da pancreatina e colocados em uma solução de meio  $\alpha$ -MEM com 10% de SBF (Vitrocell®), para bloquear a ação da enzima. Os tubos neurais obtidos ao final deste processo foram



colocados em placas de cultura de plástico de 35 mm (Corning®) com 1 ml de  $\alpha$ -MEM contendo 10% de SBF e 2% de extrato de embrião de galinha (EE) (meio básico de cultivo). Em seguida, essas placas de cultura foram colocadas em estufa úmida à 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 15 horas.

O EE é produzido a partir de um macerado de todos os tecidos (exceto os olhos) de embriões de galinha com 11 dias embrionários. No volume resultante desse processo de maceração, é adicionado igual volume de meio  $\alpha$ -MEM, e esta solução é centrifugada a 10.000 x g entre 4-7°C por 30 minutos. O sobrenadante é filtrado em membranas filtrantes de nitrocelulose de 0,8  $\mu$ m para retirada de eventuais fragmentos restantes. Finalmente, o EE é filtrado novamente a 0,45  $\mu$ m e então é mantido congelado a - 80°C. Antes de ser utilizado nas culturas o EE é filtrado em membranas de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m para esterilização do material.

### 3.4 CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CNT SOBRE PURAMATRIX™

Após 15 horas de cultura primária, os explantes dos tubos neurais foram removidos mecanicamente sob controle microscópico utilizando agulhas de tungstênio, sendo em seguida descartados com lavagens sequenciais utilizando meio  $\alpha$ -MEM. As células da CNT aderentes à placa de cultivo foram então descoladas com 500  $\mu$ l de solução de tripsina 0,05 % (Sigma®) para realização das culturas secundárias. Após cerca de 3 minutos a ação da tripsina foi bloqueada com 2 ml de meio  $\alpha$ -MEM contendo 10% SBF. As células recuperadas foram colocadas em placas de cultivo de 96 poços revestidos com 20  $\mu$ l de PuraMatrix™ nas concentrações de 0,15%, 0,25%, 0,5% e 1%. A placa foi mantida em estufa úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por sete dias, com trocas de meio básico de cultivo ( $\alpha$ -MEM com 10% SBF e 2% EE) a cada dois ou três dias.

Para o preparo da placa revestida com a matriz de PuraMatrix™, a solução mãe de 1% foi diluída em água Milli-Q® estéril. Em seguida, foram plaqueados 20  $\mu$ l em cada poço e adicionado 100  $\mu$ l de meio  $\alpha$ -MEM para a auto-montagem das fibras. A placa permaneceu em estufa úmida à 37°C por 1 hora, com troca de meio aos 30 minutos. Após este período as matrizes de PuraMatrix™ estavam prontas para receber as células da CN.

Ao sétimo dia de cultura secundária, em alguns poços de cultivo foram adicionados Fatores de Diferenciação Mesenquimais (FDM) ao meio básico de cultivo. O objetivo deste tratamento foi estimular as

células para diferenciação osteogênica e adipogênica. As trocas do meio de diferenciação também ocorreram a cada 2 ou 3 dias. Os FDM incluem  $\beta$ -glicerol fosfato (5 mM); ácido ascórbico (25  $\mu$ l/ml); dexametasona (0,05  $\mu$ M); insulina (2,5  $\mu$ l/ml); indometacina (100  $\mu$ M) e isobutilmetilxantina (0,5 mM).

As culturas foram mantidas por dois diferentes tempos adicionais: 14 e 21 dias. Nas culturas de até 14 dias, foram plaqueadas 400 células por poço em meio básico de cultivo em 4 diferentes concentrações de PuraMatrix™: 0,15%; 0,25%; 0,5% e 1%. Em culturas de 21 dias, foram plaqueadas 50 células por poço em meio básico de cultivo e apenas na concentração de 0,15% de PuraMatrix™. As culturas foram fixadas por 40 minutos em formaldeído 3,7% (diluído em PBS 1x) para posterior identificação dos diferentes tipos celulares diferenciados da CN.

### 3.5. ANÁLISES FENOTÍPICAS

As análises qualitativas e quantitativas dos diferentes tipos celulares gerados nas culturas secundárias foram realizadas através de reações de imunofluorescência indireta específicas e colorações. Em especial para a identificação do fenótipo ósseo, as células foram analisadas em 14 dias nas três concentrações de PuraMatrix™ (0,15%; 0,25% e 0,5%) e em 21 dias de cultivo em PuraMatrix™ 0,15%. Para os demais fenótipos, as análises ocorreram apenas em 14 dias em três concentrações de PuraMatrix™ (0,15%; 0,25% e 0,5%).

#### 3.5.1 Imunofluorescência indireta

As culturas celulares previamente fixadas com formaldeído 3,7% foram incubadas por 30 minutos em uma solução de PBS-Triton X-100® (0,25%, Sigma®) com a finalidade de permeabilizar os poros da membrana celular e com 10% SBF para bloquear os sítios inespecíficos. As células permaneceram com 50  $\mu$ l de anticorpos primários específicos (Tabela 2) *overnight* à 4°C.

Tabela 2- Anticorpos primários usados para identificação de células que se diferenciaram na cultura sobre PuraMatrix™.

<b>Ac Primário</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Tipo/Origem</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Diluição</b>
Anti- $\alpha$ -SMA	Músculo Liso	Monoclonal/ camundongo	IgG2a	1:800
Anti- Condroitin Sulfato	Condrócitos	Monoclonal/ camundongo	IgM	1:1000
Anti- HNK1	Glia	Monoclonal/ camundongo	IgM	MC
Anti- MelEM	Melanócitos/ precursores de melanócitos	Monoclonal / camundongo	IgG1	MC
Anti- Tirosina Hidroxilase	Células adrenérgicas	Monoclonal/ camundongo	IgG2a	MC
SB-3	Osteoblastos	Monoclonal/ camundongo	IgG2b	MC
SB-5	Osteócitos	Monoclonal/ camundongo	IgM	MC

Anticorpos utilizados para a identificação dos fenótipos diferenciados a partir de progenitores da CNT, tipo e origem onde o anticorpo foi produzido, isotipo e diluição utilizada. MC: meio condicionado. Fonte: Produzida pelo autor (2016).

Após a marcação com os anticorpos primários, as células foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, com 50  $\mu$ l de anticorpos secundários (conforme os isotipos descritos na Tabela 2) na concentração de 1:500 (Alexa® 594 e Alexa® 488, Sigma®). Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS-Tween® 0,25% as imunomarcações foram observadas e fotografadas no microscópio de epifluorescência e contraste de fase Olympus® IX71 com câmera Olympus DP71. Os núcleos foram corados por 3 minutos com DAPI (1 mg/ml; Sigma®), seguidos de uma lavagem de 5 minutos com PBS-Tween® 0,25%.

### 3.5.2 Colorações

As colorações foram utilizadas para identificar adipócitos, osteócitos e condrócitos. Para identificar a presença de adipócitos, cada poço da placa de 96 poços recebeu 50 µl de solução estoque de *Oil Red* 0,5% diluído em água destilada (6:4) (Sigma®) por 30 minutos para marcação de lipídeos. Em seguida, esses poços foram lavados com PBS 1x até total retirada do excesso de corante. Para a marcação de glicosaminoglicanos presentes em condrócitos, as células foram coradas por 40 minutos com Azul de alcian 1% diluído em água destilada, também com 50 µl de corante, e lavadas com PBS 1x até total retirada do excesso de corante. Para a identificação de osteócitos, as células em ambas as condições foram coradas por 30 minutos com 50 µl de Vermelho de Alizarina 2% (Sigma®) para marcação de matriz mineralizada e para marcação de ALP foi usado o kit 85L2 da Sigma.

Para a coloração de ALP, foi adicionado 50 µl da solução em cada poço da placa de 96 poços, onde permaneceu por 30 minutos sem exposição à luz. Após esse tempo, os poços foram lavados com água destilada até a completa retirada da solução. O preparo da solução é o mesmo descrito para a coloração de lâminas histológicas (ver 3.2).

## 3.6. ANÁLISES DE FREQUENCIAS FENOTÍPICAS E ANÁLISES QUANTITATIVAS

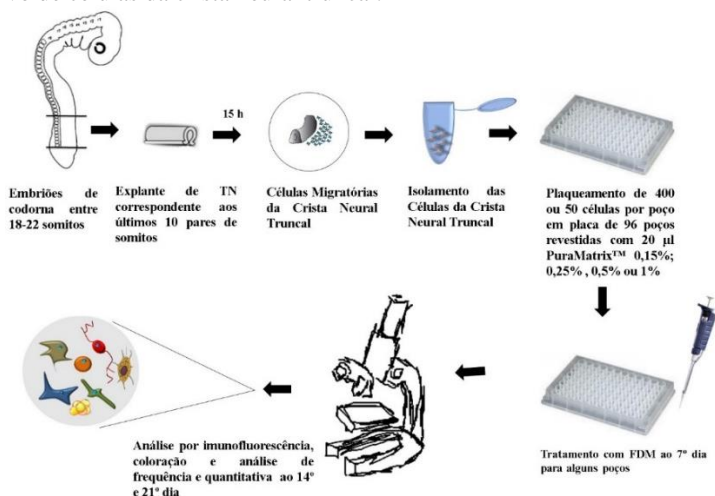
Para análise de frequência dos diferentes tipos celulares gerados (fenótipos), cada poço da placa de 96 poços foi analisado por microscopia de epifluorescência. A partir desses dados, foi feita a distribuição de frequências. A fim de obter os valores relativos (porcentagem), para cada distribuição de frequência o valor de poços positivos para um dado fenótipo foi dividido pelo número total de poços do experimento.

Devido ao ambiente formado pela matriz e a grande quantidade de células, tornou-se difícil a quantificação individual dos fenótipos celulares. Desta forma, a quantidade de cada fenótipo foi estimada em porcentagem de células. Para cada porcentagem estimada, foi atribuído um sinal, como segue: “+” (pequeno) para até 25% de células totais, “++” (médio) para até 50%, “+++” para até 75% e “++++” para até 100% das células totais.

### 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística das frequências, foi realizado o teste  $\chi^2$  para cada fenótipo individual, sendo comparados entre os grupos controles e os grupos tratados com FDM nas três concentrações de Puramatrix™ analisadas. Também foram comparados os dados obtidos na situação controle e tratado com FDM das mesmas concentrações de Puramatrix™. Foram considerados significativos os resultados com  $P \leq 0,05$ .

Figura 9- Esquema representativo da metodologia utilizada para obtenção e cultivo de células da crista neural truncal.



Fonte: produzida pelo autor (2016).

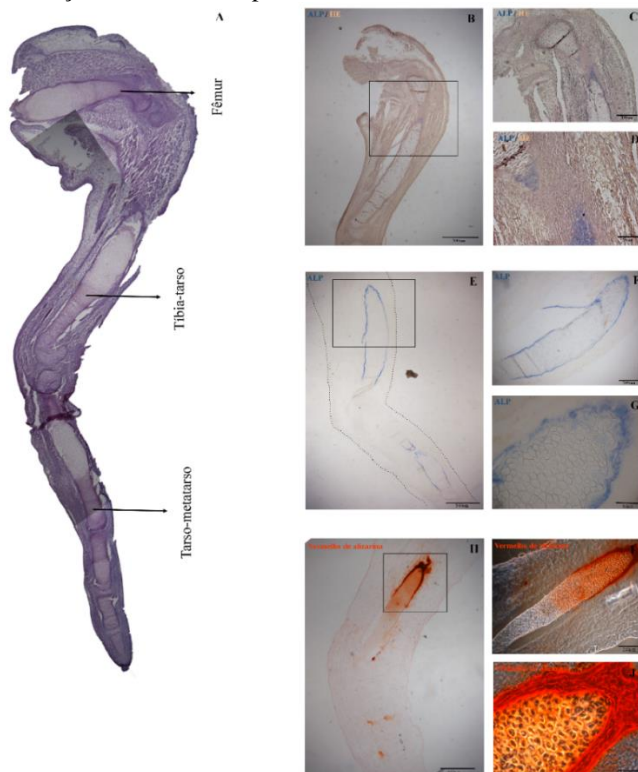


## 4 RESULTADOS:

### 4.1 SB-3 E SB-5 MARCAM OSTEÓCITOS

Inicialmente realizamos colorações para identificação do tecido ósseo em embrião de codornas no estágio 35 HH. Ambas as marcações para Vermelho de alizarina e ALP apresentaram-se ao redor do fêmur, na ponta proximal da tíbia-tarso e na ponta distal do tarso-metatarso, mostrando-se correlacionadas e indicando os locais de osteogênese (Figura 10).

Figura 10- Colorações em membros posteriores de embriões de codornas.



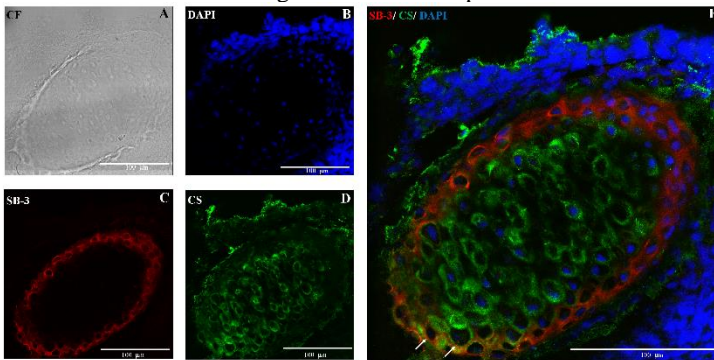
Imagens de microscopia em cortes histológicos de membros posteriores de embriões de codornas em estágio de desenvolvimento de 35 HH. (A) Histologia do membro posterior de codorna no estágio 35 HH corado com HE; (B, C e D) coloração com HE e ALP na periferia do fêmur e na ponta proximal da tíbia-tarso

vista em menor aumento de 10x (B) e em aumento de 20x (C) e 40x (D); (E, F e G) coloração de alcalina fosfatase (ALP) na ponta proximal da tíbia-tarso e distal do tarso-metatarso observada nos aumentos de 10x (E), 20x (F) e 40x (G) e (H, I e J) coloração com Vermelho de alizarina na ponta proximal da tíbia-tarso nos aumentos de 10x (H), 20x (I) e 40x (J). Fonte: produzida pelo autor (2016).

Para nos certificarmos da funcionalidade e especificidade de marcação dos anticorpos SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5 descritos por Bruder e Caplan (1989) como marcadores de osteoblastos e osteócitos, foram realizados cortes histológicos de membros posteriores de embriões de codornas em estágio de desenvolvimento 35 HH e incubadas com os anticorpos SB-1, SB-2, SB-3 e SB-5.

Houveram marcações para SB-3 e SB-5 na periferia do fêmur e na ponta distal do tarso-metatarso (Figura 11 e Figura 12, respectivamente) (confirmando assim as marcações de Vermelho de alizarina e ALP). A marcação para SB-3 parece em raras áreas apresentar sobreposição com condroitin sulfato (marcador de condrócitos, regiões em amarelo, indicada por setas na Figura 11E). Por outro lado, a marcação para SB-5 não pareceu sobrepor-se com condroitin sulfato, evidenciando que este marcador é realmente muito específico para a linhagem osteocítica. Os anticorpos SB-1 e SB-2 foram descartados de nosso estudo uma vez que SB-1 marcou regiões outras que não os centros de ossificação e SB-2 não apresentou uma marcação suficiente forte para ser utilizado (Figura 13).

Figura 11- Marcações de imunohistoquímica indireta para detecção de osteoblastos em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas.

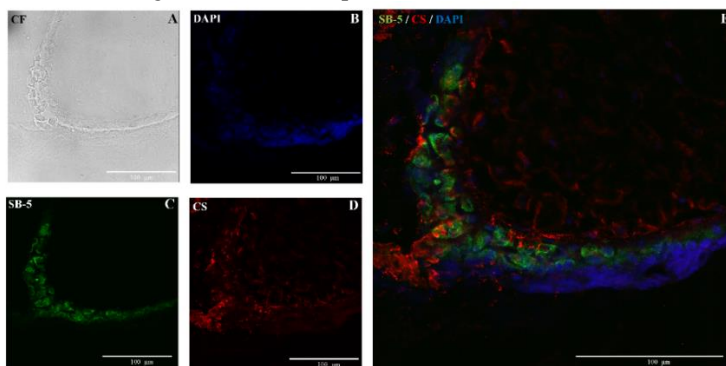


Imagens de microscopia confocal revelando reações imunohistoquímicas para detecção de osteoblastos em membros posteriores de embriões de codornas em estágio 35 HH. (A) Campo claro; (B) marcação dos núcleos com DAPI; (C)



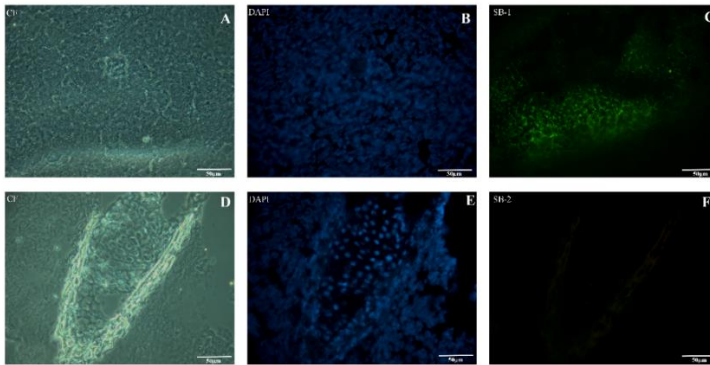
marcação com SB-3 e (D) condroitin sulfato (ambos na periferia do fêmur) e (E) sobreposição das marcações de DAPI, SB e CS. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Figura 12 - Marcações de imunohistoquímica indireta para detecção de osteócitos em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas.



Imagens de microscopia confocal revelando reações imunohistoquímicas para detecção de osteócitos em membros posteriores de embriões de codornas em estágio 35 HH. (A) Campo claro; (B) marcação dos núcleos com DAPI; (C) marcação com SB-5 e (D) condroitin sulfato (ambos na periferia do fêmur) e (E) sobreposição das marcações de DAPI, SB e CS. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Figura 13- Marcações de imunohistoquímica indireta em lâminas histológicas de membros posteriores de codornas.

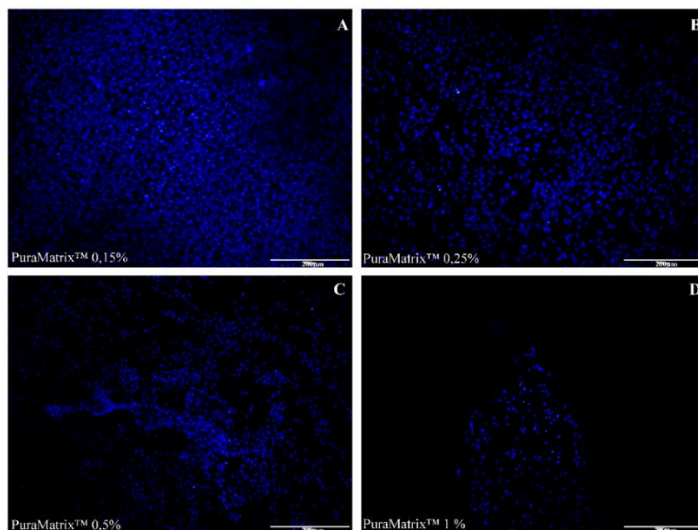


Imagens de microscopia de contraste de fase e epifluorescência. (A e D) Campo claro; (B e E) marcação dos núcleos com DAPI; (C) marcação para SB-1 em regiões que não condizem com centros de ossificação e (F) marcação ausente para SB-2. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

#### 4.2 AS QUATRO CONCENTRAÇÕES DE PURAMATRIX™ PERMITEM O CULTIVO DE CÉLULAS DA CNT

Inicialmente, foi comparado o comportamento das células da CNT em quatro concentrações distintas de Puramatrix™ – 0,15%, 0,25%, 0,5% e 1%. Foi observado que as concentrações de PuraMatrix™ 1% e 0,5% apresentaram uma menor quantidade de células da CNT no 14º dia de cultivo quando comparadas às concentrações 0,25 % e 0,15 % (Figura 14).

Figura 14- Representação da quantidade de células da CNT totais em 14 dias de cultura.



Imagens de microscopia de epifluorescência revelando os núcleos celulares detectados através da coloração com DAPI (em azul). (A) Imagens representativas do número de células em PuraMatrix™ 0,15%; (B) PuraMatrix™ 0,25%; (C) PuraMatrix™ 0,5% e (D) PuraMatrix™ 1%. Aumento de 4x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Como a concentração de 1% PuraMatrix™ apresentou um número extremamente reduzido de células, as análises posteriores foram realizadas apenas com as concentrações de 0,5%; 0,25% e 0,15% nas condições Controle e Tratado com FDM.

#### 4.3 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PURAMATRIX™ SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNT

Com o objetivo de verificar se as três concentrações de PuraMatrix™ analisadas (0,15%, 0,25% e 0,5%) eram capazes de permitir e/ou influenciar de alguma maneira a diferenciação de células progenitoras da CNT, foram realizadas reações de imunocitoquímica e colorações específicas para identificar os principais derivados da CN.

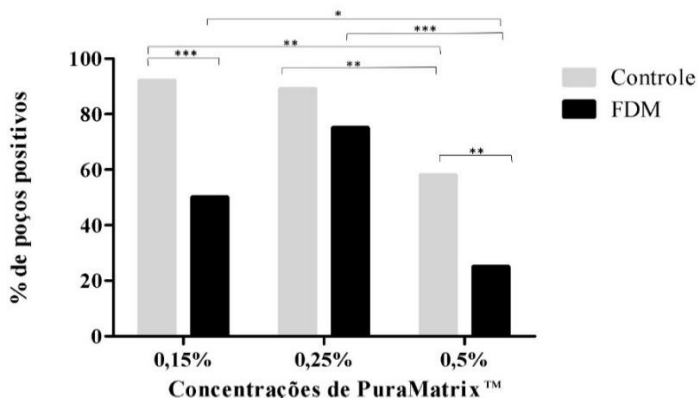
Foram feitas análises qualitativas (a frequência de poços de cultura apresentando determinado fenótipo) e quantitativas (número estimado de cada fenótipo presente nas culturas). Os tipos celulares analisados foram: células gliais (Figura 15 e Figura 16), células neuro-adrenérgicas (Figura 17 e Figura 18), melanócitos (Figura 19 e Figura 20), células musculares lisas (Figura 21 e Figura 22), adipócitos (Figura 23 e Figura 24), condrócitos (Figura 25, Figura 26 e Figura 27) todos analisados em 14 dias de cultura. Por fim, osteoblastos e osteócitos foram identificados em 14 e 21 dias de cultivo (Figura 28 e Figura 29 para culturas de 14 dias e Figura 30 e Figura 32 para culturas de 21 dias).

#### **4.3.1 Células gliais:**

Em relação ao fenótipo glial, observou-se em culturas controles, que as concentrações mais baixas (0,15% e 0,25%) de PuraMatrix™ permitiram maior frequência de poços positivos para células gliais comparada a concentração de 0,5% (chegando até 40% a mais), apresentando significância estatística (Figura 15). Este mesmo resultado também foi observado nas culturas tratadas com FDM, entretanto, neste caso, a concentração de 0,25% apresentou um leve incremento na frequência de poços contendo células gliais em relação a concentração de 0,15%, mesmo não havendo significância estatística. Quando comparados os grupos controle e tratado com FDM nas concentrações de 0,15% e 0,5% de PuraMatrix™, há diferenças significativas na frequência de poços apresentando células gliais (Figura 15).

É importante salientar que houve uma diminuição no número de poços positivos para células gliais com tratamento com FDM nas três concentrações de PuraMatrix™ analisadas (Figura 15). Apesar de ser colocado muito tarde (após sete dias) nos cultivos celulares, o meio FDM parece ter alterado de alguma forma a sobrevivência e/ou diferenciação destas células.

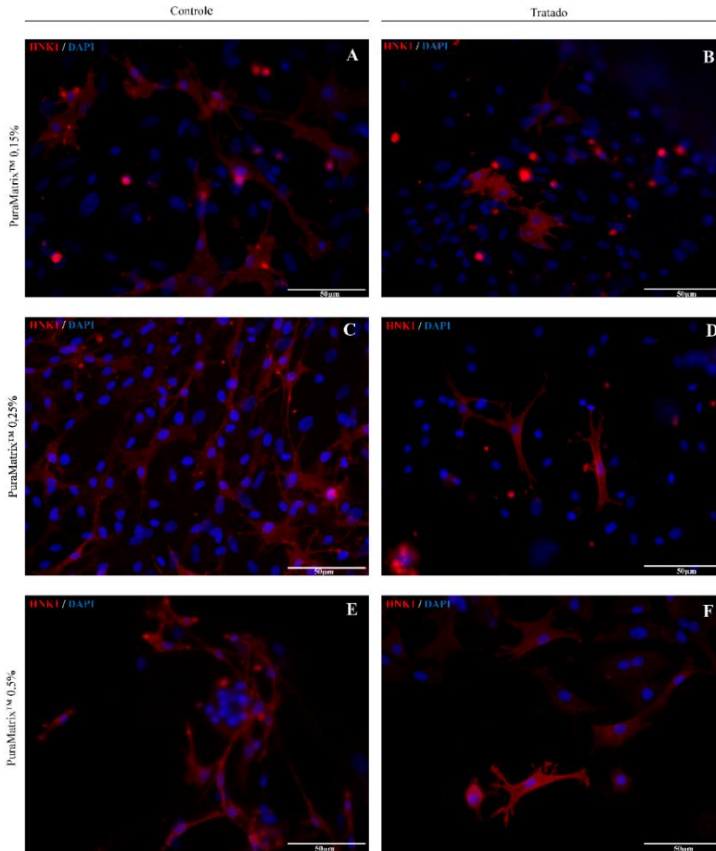
Figura 15 - Análise de frequência de poços positivos para células gliais em culturas da CNT.



Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para células gliais em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para células gliais em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para células gliais em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n=26 para a condição controle de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% e n=28 para condição tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

Em relação a quantidade de células diferenciadas por poço, o número de células gliais mostra-se maior nas concentrações de PuraMatrix™ 0,25% e 0,5% controles (quantidade considerada média, indicado por ++, indicado na Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente). Em ambas concentrações de PuraMatrix™, observa-se uma redução no número de células gliais quando as culturas são tratadas com FDM (quantidade considerada pequena, indicado por +, nas Tabelas 3, 4 e 5). Curiosamente, o número de células gliais não se altera para ambas condições de PuraMatrix™ 0,15%. Na concentração de 0,15% de PuraMatrix™ as células apresentam uma morfologia mais espreada, tanto no grupo controle quanto tratado com FDMs (Figura 15 A-B). Nas concentrações de PuraMatrix™ 0,25% e 0,5% as células gliais são mais fusiformes, alongadas e exibindo diversas projeções membranares (que sugerimos serem filopódios) (Figura 16 C-D e E-F, respectivamente). Esta morfologia foi observada em ambas as condições controle e tratado com FDMs.

Figura 16- Imagens representativas da diferenciação e morfologia de células gliais.

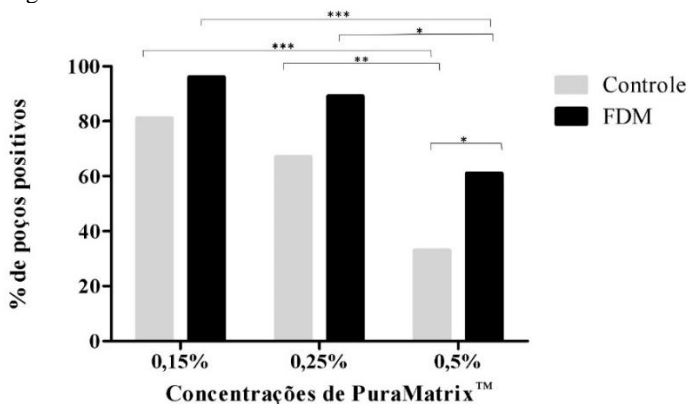


Imagens de microscopia de epifluorescência revelando as reações imunocitoquímicas através do anticorpo HNK1 para detecção de células gliais (em vermelho). (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

### 4.3.2 Células adrenérgicas

Assim como observado em relação ao fenótipo glial, a frequência de poços que continham células adrenérgicas mostrou-se aumentada nas concentrações de 0,15% e 0,25% de PuraMatrix™ quando comparadas à concentração de PuraMatrix™ de 0,5%. Isto foi observado tanto nos grupos controles quanto nos grupos que receberam tratamento com os FDM. Observamos ainda em todas as concentrações de PuraMatrix™ uma tendência no aumento da frequência de poços com marcações positivas para neurônios adrenérgicos quando as culturas foram tratadas com os FDM. Entretanto, apenas na concentração de PuraMatrix 0,5% foi detectada uma diferença significativa estatisticamente quando comparado ao seu controle (Figura 17). Importante destacar que neste caso, o resultado foi justamente ao contrário do que foi observado para o fenótipo glial em que o tratamento com os FDM diminuía a frequência de poços positivos para glia.

Figura 17- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células adrenérgicas em culturas da CNT.



Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para células neuro-adrenérgicas em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para células neuro-adrenérgicas em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para células neuro-adrenérgicas em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n= 26 para a condição controle de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% e n= 28 para condição tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro

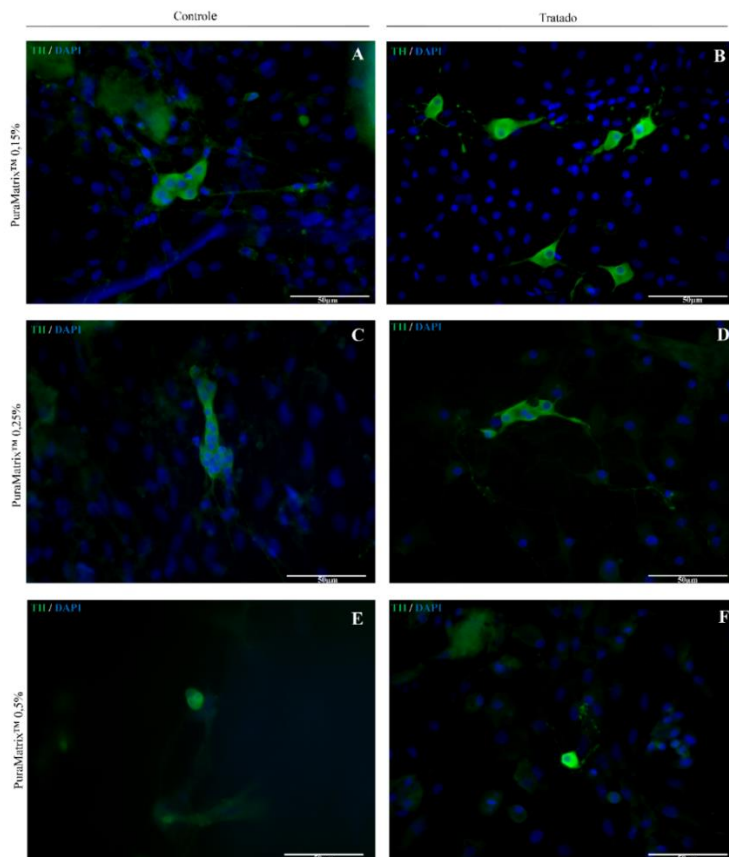
experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

A quantidade de células adrenérgicas por poço se mantém pequena independentemente de tratadas ou não com FDM nas concentrações de 0,15 e 0,25% PuraMatrix™ (25%, indicado por +). Por outro lado, observa-se um aumento no número de células adrenérgicas na concentração de 0,5% de PuraMatrix™ quando tratadas com FDM, ainda que a quantidade de células permaneça pequena (indicado por +). Entretanto, estas células distribuem-se de forma muito heterogênea nos poços e apresentam-se frequentemente de maneira isolada e não em grupos, o que dificulta a visualização de uma grande quantidade delas no mesmo campo de visão (Figura 18).

As células apresentaram-se em forma de grumos ou nódulos na concentração de PuraMatrix™ 0,25% em controle e tratado (Figura 18C e D, respectivamente) e com uma morfologia mais alongada. Já para as concentrações de PuraMatrix™ 0,15% e 0,5% as células foram observadas sozinhas ou em pequenos grupos com morfologia típica (arredondadas e com prolongamentos) (Figura 18 A-B e E-F, respectivamente).



Figura 18- Imagens da diferenciação e morfologia de células adrenérgicas.

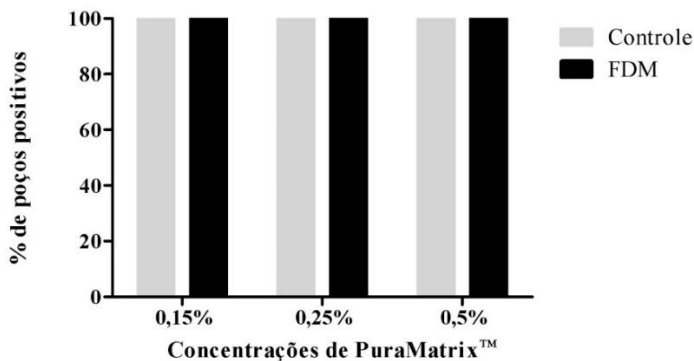


Imagens de microscopia de epifluorescência revelando as reações imunocitoquímicas através do anticorpo TH para detecção de células adrenérgicas (em verde). (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

#### 4.3.3 Células melanocíticas

A porcentagem de poços com a presença de melanócitos não se mostrou alterada entre as três concentrações de PuraMatrix™ em ambas condições de cultura (controle e FDM) estando presente em 100% dos poços analisados (Figura 19).

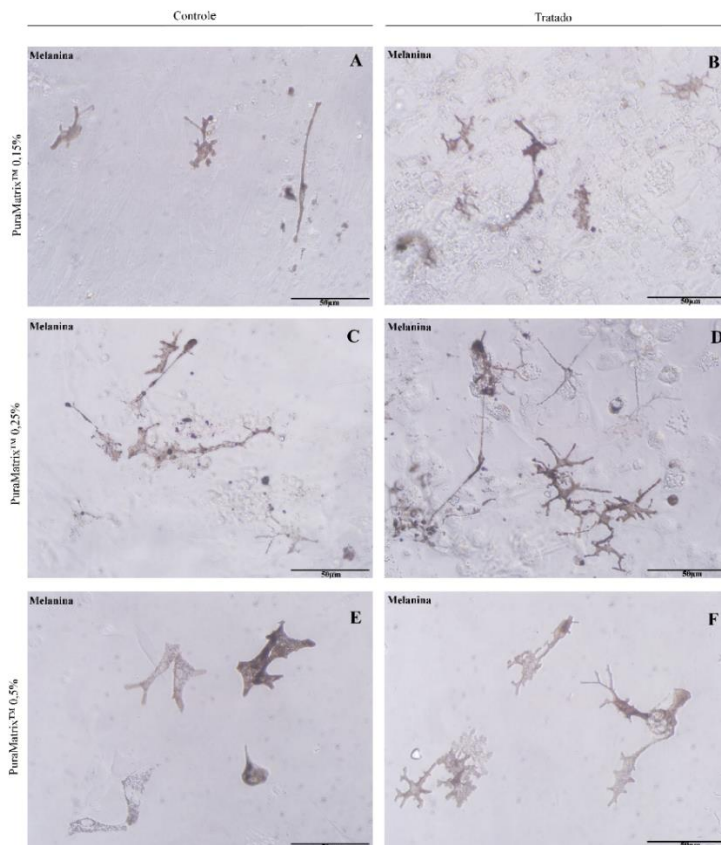
Figura 19- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células melanocíticas em culturas da CNT.



Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para células melanocíticas em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para células melanocíticas em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para células melanocíticas em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n= 28 para a condição controle e tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

A quantidade de melanócitos não se altera entre as diferentes concentrações de PuraMatrix™ utilizadas e entre as culturas controles e tratadas com FDM, sendo até 25% de melanócitos por poço (quantidade considerada pequena- +). Nas concentrações mais baixas de PuraMatrix™ (0,15% e 0,25%) as células apresentam-se com morfologia mais alongada, fina e com mais prolongamentos (Figura 20 A-B e C-D, respectivamente). Na maior concentração de PuraMatrix™ analisada (0,5%), as células são mais espriadas e com menos prolongamentos (Figura 20E-F).

Figura 20- Imagens da diferenciação e morfologia de células melanocíticas.



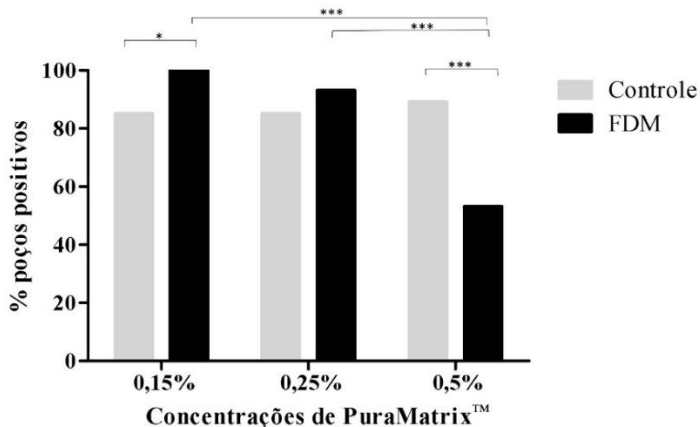
Imagens de microscopia de contraste de fase com células exibindo a presença de melanina. (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

#### 4.3.4 Células musculares lisas

O número de poços com células musculares lisas na condição controle para as três concentrações de PuraMatrix™ não apresenta diferenças significativas, estando presente entre 85% a 90% dos poços. Quando estimuladas com os FDM foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de 0,15% e 0,25% de PuraMatrix™ em relação a concentração de 0,5%. Contudo, apenas foram observadas

diferenças significativas entre as condições controle *versus* tratado com FDM nas concentrações 0,15% e 0,5% de PuraMatrix™ (Figura 21).

Figura 21- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células musculares lisas em culturas da CNT.

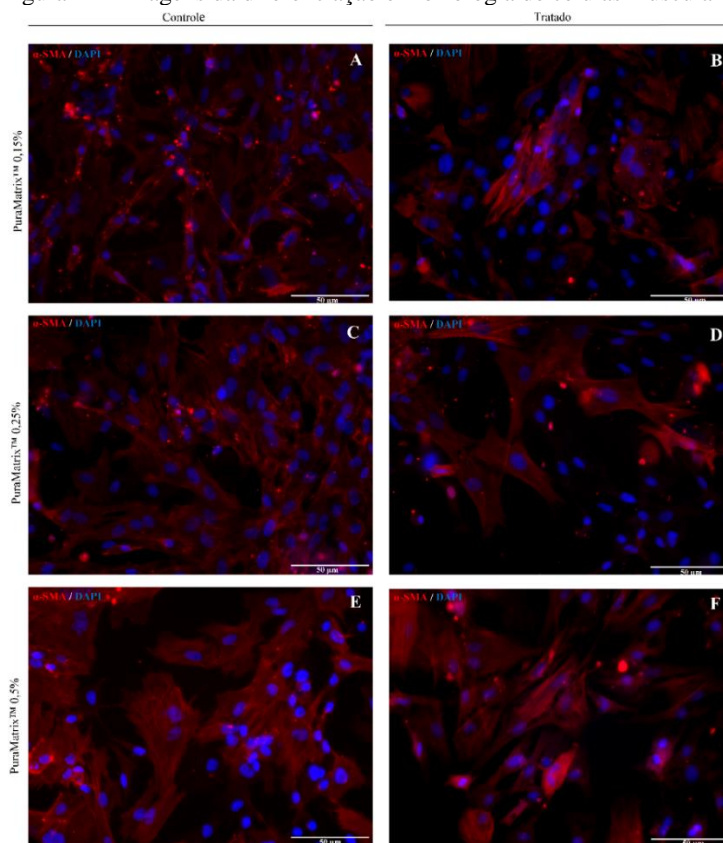


Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para células musculares lisas em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para células musculares lisas em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para células musculares lisas em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n= 26 para a condição controle de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% e n= 28 para condição tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro experimentos independentes. \* P<0,05; \*\*P< 0,001 e \*\*\*P<0,0001). Fonte: produzida pelo autor (2016).

O número de células musculares lisas é maior para a condição controle de PuraMatrix™ 0,15% (Figura 22A) (cerca de 75%, indicado por +++ na Tabela 3). Além disso, há uma tendência à diminuição de células musculares lisas nas culturas tratadas com FDM nas concentrações de 0,15% e 0,25% quando comparados a suas respectivas condições controle. Por exemplo, em Puramatrix™ 0,15% houve uma redução de 75% para 50% de células musculares lisas sob tratamento com FDM (indicado por +++ e ++, respectivamente na Tabela 3). Já para PuraMatrix™ 0,25% houve uma redução de 50 para 25% de células musculares lisas (indicado por ++ e + na Tabela 4) (Figura 22 B e D, respectivamente). A quantidade de células musculares lisas se mantém para ambas as condições de PuraMatrix™ 0,5% (50% em ambas,

indicado por ++ na Tabela 5) (Figura 22 E-F). A morfologia celular não se altera de acordo com as concentrações de PuraMatrix™ ou tratamento com FDMs. As células mantêm uma morfologia característica (fusiformes com filamentos de actina bem marcados), mas apresentam-se mais alongadas em campos com maior número de células e mais espalhadas quando em campos com um número menor de células (Figura 22).

Figura 22- Imagens da diferenciação e morfologia de células musculares lisas.

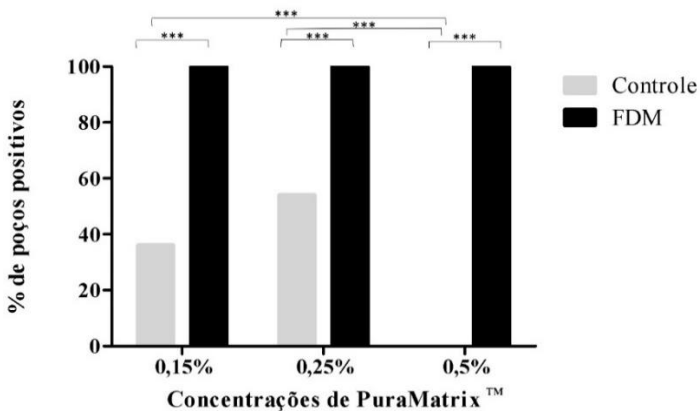


Imagens de microscopia de epifluorescência revelando as reações imunocitoquímicas através do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA para detecção de células musculares lisas (em vermelho). (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

### 4.3.5 Células adipocíticas

Quando cultivadas nas concentrações de PuraMatrix™ 0,15% e 0,25%, algumas células diferenciaram-se em adipócitos mesmo sem o estímulo dos FDM, sendo que a porcentagem de poços com adipócitos foi maior para a concentração de PuraMatrix™ 0,25% (Figura 23). Curiosamente, adipócitos não foram observados em culturas controles sobre PuraMatrix™ 0,5%, havendo diferenças significativas entre os controles de PuraMatrix™ 0,15% e 0,25% quando comparado com PuraMatrix™ 0,5%. Sob tratamento com os FDM, as três concentrações de Puramatrix™ testadas apresentaram 100% dos poços com diferenciação adipogênica, apresentando diferenças significativas em relação aos seus controles (Figura 23).

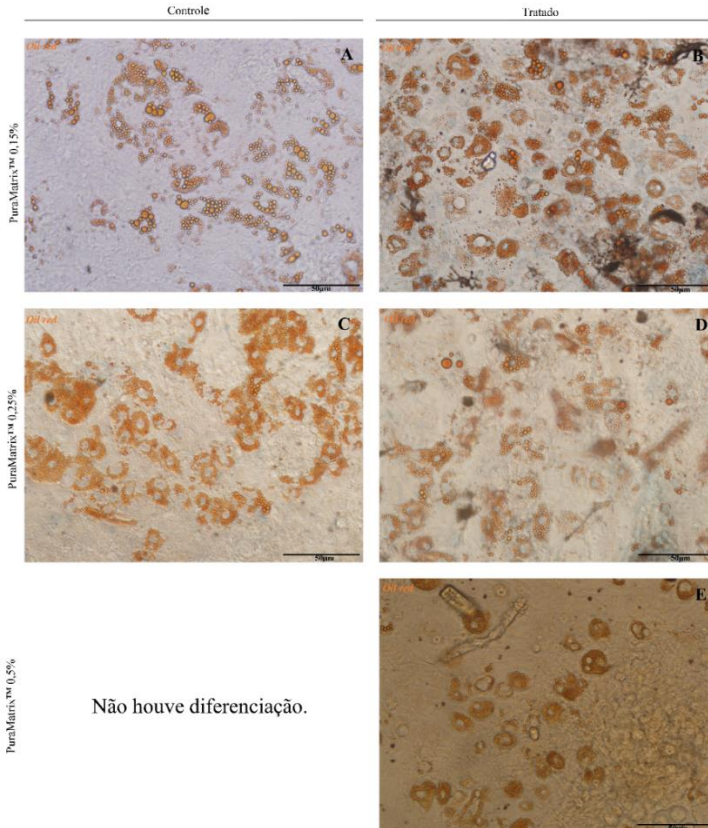
Figura 23- Representação gráfica da frequência de poços positivos para células adipocíticas em culturas da CNT.



Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para células adipocíticas em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para células adipocíticas em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para células adipocíticas em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n= 26 para a condição controle de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% e n= 28 para condição tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

O número de células diferenciadas para adipócitos aumenta quando estimuladas com FDM nas três concentrações de PuraMatrix™ quando comparadas com as culturas controles, sendo maior para as concentrações mais baixas (PuraMatrix™ 0,15% e 0,25%) (50%, indicado por ++ nas Tabelas 3 e 4, respectivamente). A concentração de PuraMatrix™ 0,5% estimulada com o FDM apresenta uma pequena quantidade de adipócitos diferenciados por poço (quantidade pequena-25% indicado por + na Tabela 5). Estes dados corroboram com os dados da análise de frequência apresentados na Figura 23, onde o tratamento com FDM aumentou o número de poços com células diferenciadas para estes fenótipos. A morfologia adipocítica mantém-se igual em todas as concentrações e condições (Figura 24).

Figura 24- Imagens da diferenciação e morfologia de células adipocíticas.



Imagens de microscopia de contraste de fase exibindo células com acúmulo de gordura e coradas com Oil red para detecção de células adipocíticas. (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% tratado. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

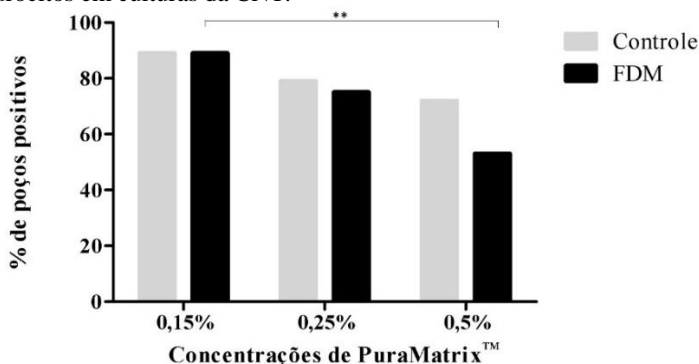
#### 4.3.6 Células condrocíticas

Em relação a presença de nódulos de cartilagem, foi observado que cerca de 80-90% dos poços de cultura em ambas as condições (controle e tratado com FDM) exibiram diferenciação condrocítica nas concentrações de PuraMatrix™ 0,15% (Figura 25). Já, para as condições de 0,25% e 0,5% a porcentagem de poços mostra-se inferior à 80%. Com



o tratamento com os FDM, o número de poços com nódulos de cartilagens diminuiu para PuraMatrix™ 0,25%, mas sobretudo para PuraMatrix™ 0,5%. Nesta última concentração foi observada uma redução significativa na frequência de poços com cartilagem em relação à condição tratada da concentração de 0,15% de PuraMatrix™ (Figura 25).

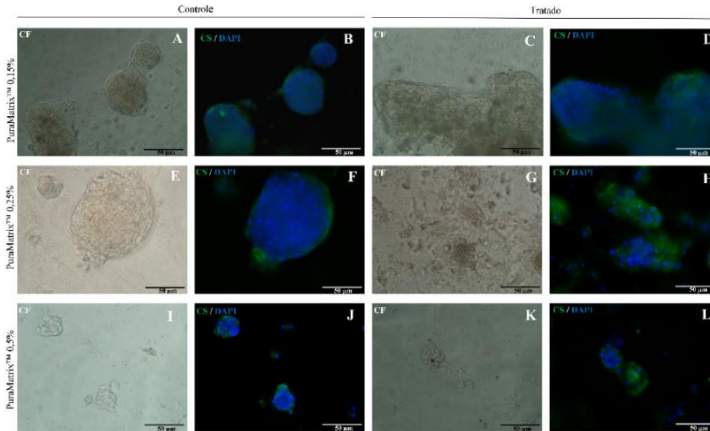
Figura 25- Representação gráfica da frequência de poços positivos para condrócitos em culturas da CNT.



Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para condrócitos em culturas da CNT realizadas sobre três concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para condrócitos em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para condrócitos em culturas tratadas com FDM. (n= 36 para as condições de PuraMatrix™ 0,5%, n= 26 para a condição controle de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% e n= 28 para condição tratado de PuraMatrix™ 0,25% e 0,15% de quatro experimentos independentes. \* P≤0,05; \*\*P≤ 0,001 e \*\*\*P≤0,0001). Fonte: produzida pelo autor (2016).

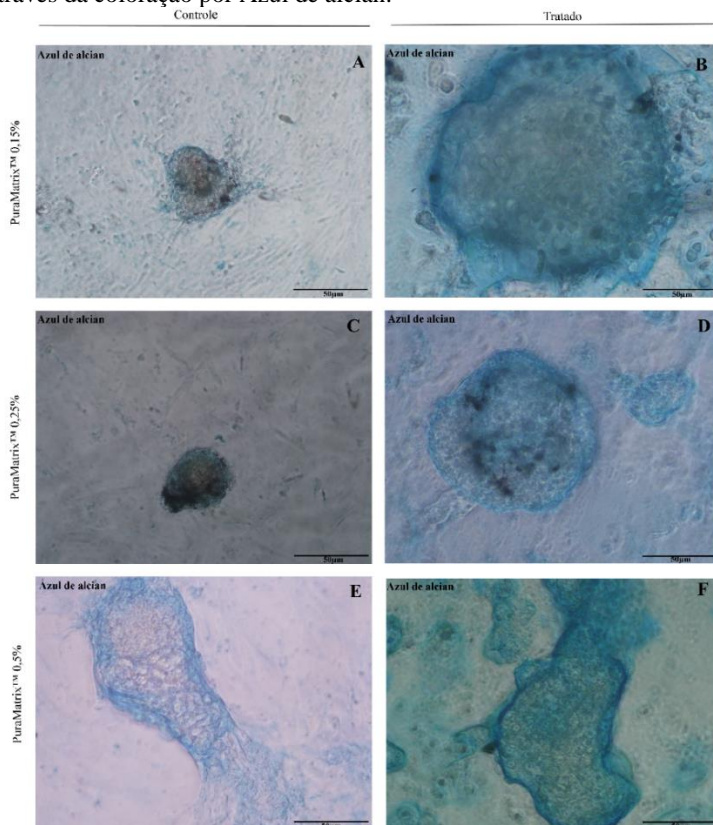
Curiosamente, a quantidade de condrócitos e nódulos de cartilagem aumenta quando estimuladas com FDM nas concentrações mais baixas de PuraMatrix™ (0,15% e 0,25%) quando comparadas com as culturas controles (de 25% para 50%, indicado por + e ++ nas Tabelas 3 e 4, respectivamente). Na concentração de PuraMatrix 0,5%, a quantidade de condrócitos por poço não se altera com o tratamento, permanecendo o equivalente a quantidade média (50%, indicado por ++ na Tabela 5). Em sua maioria, células condrocíticas apresentavam-se em nódulos tridimensionais, mas também podiam ser observados em pequenos e/ou grandes grupos bidimensionais (Figura 26 e Figura 27).

Figura 26- Imagens da diferenciação e morfologia de nódulos de condrócitos através de imunocitoquímica para condroitin sulfato.



Imagens de microscopia de contraste de fase e epifluorescência revelando as reações imunocitoquímicas através do anticorpo anti-condroitin sulfato para detecção de glicosaminoglicanos presentes em cartilagens (em verde). PuraMatrix™ 0,15% controle (contraste de fase em A e marcação em B) e tratado (contraste de fase em C e marcação em D); PuraMatrix™ 0,25% controle (contraste de fase em E e marcação em D) e tratado (contraste de fase em G e marcação em H) e PuraMatrix™ 0,5% controle (contraste de fase em I e marcação em J) e tratado (contraste de fase em K e marcação em L). Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016)

Figura 27- Imagens da diferenciação e morfologia de nódulos de condrócitos através da coloração por Azul de alcian.



Imagens de microscopia de contraste de fase exibindo nódulos corados com Azul de Alcian, para detecção de glicosaminoglicanos em nódulos de cartilagem. (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

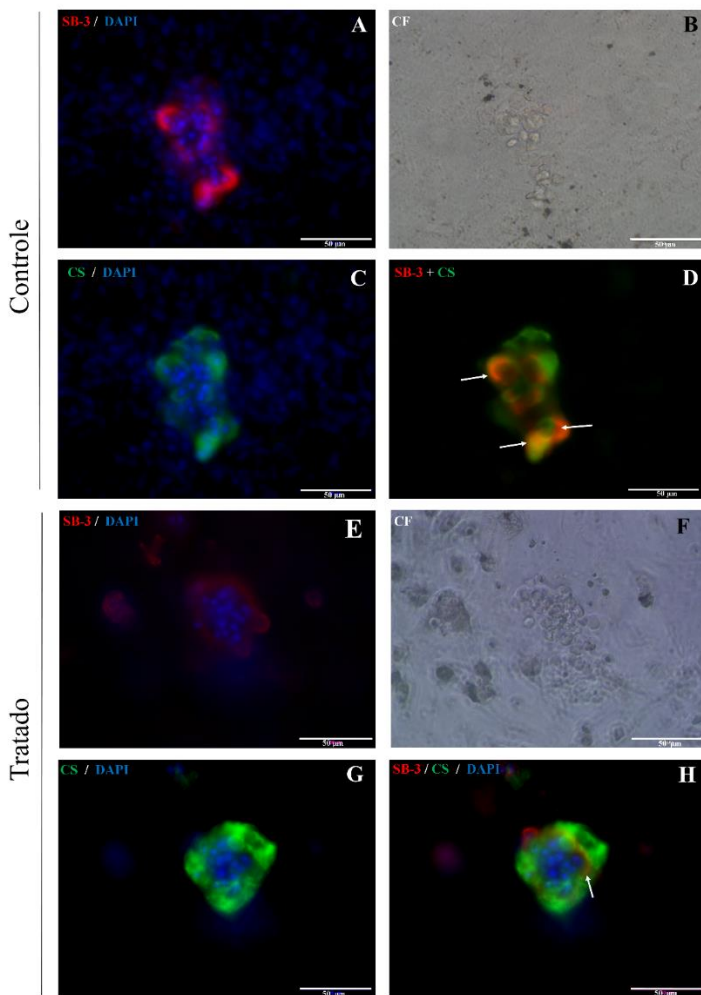
#### 4.3.7 Células ósseas

Para a identificação do fenótipo osteoblástico e osteocítico em 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente, as células foram coradas com Vermelho de Alizarina (Sigma®), analisadas com o kit para identificação de ALP (Sigma®), e detectadas através de reações de imunocitoquímica com os anticorpos SB-3 e SB-5.

#### 4.3.7.1. Análises de osteócitos em 14 dias de cultura

Os anticorpos SB-3 e SB-5 apresentaram marcação em culturas de 14 dias tanto para a situação controle quanto para tratado com FDM nas concentrações de PuraMatrix™ 0,15% (Figura 28 e Figura 29) e PuraMatrix™ 0,25% (Figura 30). Contudo, assim como observado nas marcações imunohistoquímicas realizadas nos membros posteriores de aves *in vivo*, a marcação para SB-3 na condição controle e tratado, se sobrepôs à marcação para condroitin sulfato (Figura 28). Isto evidencia que apenas SB5 pode ser considerado um marcador exclusivo da linhagem óssea (Figura 29).

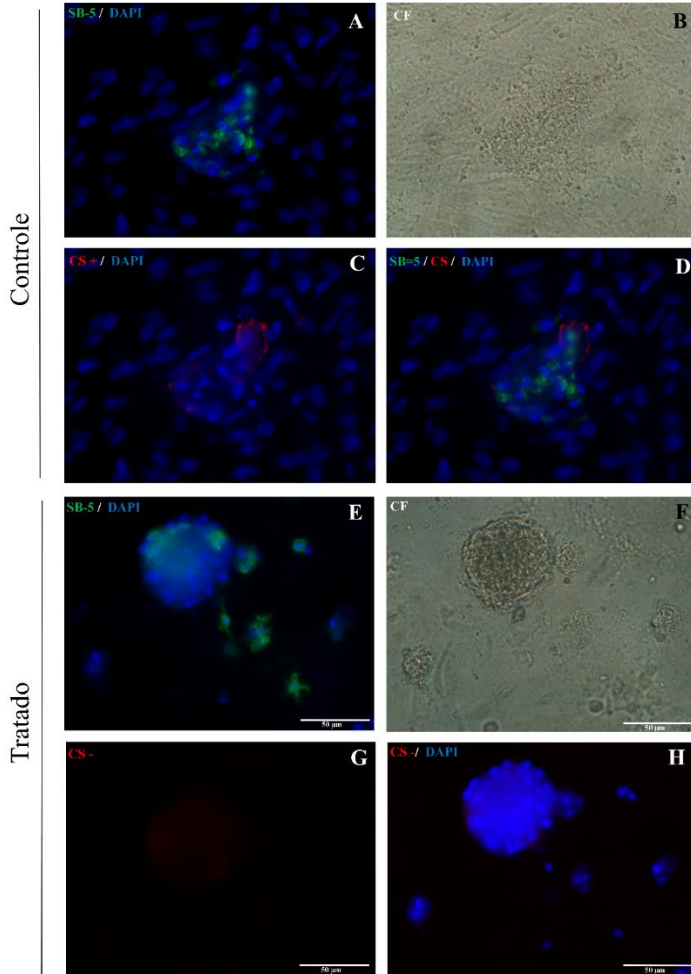
Figura 28- Análise da diferenciação de osteoblastos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15%.



Imagens de microscopia de epifluorescência em culturas de 14 dias controles e tratadas com FDM revelando através das reações de imunocitoquímicas a marcação para o anticorpo SB-3 (A e E) (em vermelho), (B e F) os respectivos contrastes de fase (CF), (C e G) marcação para Condroitin Sulfato (em verde) e (D e H) sobreposição entre SB-3 (vermelho) e Condroitin Sulfato (verde). As zonas de colocalização entre as marcações podem ser observadas em laranja (indicadas pelas setas). Os núcleos celulares foram detectados através da

coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

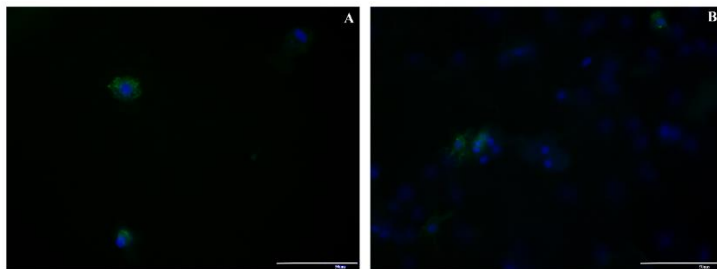
Figura 29- Análise da diferenciação de osteoblastos-osteocíticos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15%.



Imagens de microscopia de epifluorescência em culturas de 14 dias controles e tratadas com FDM revelando através das reações de imunocitoquímicas a marcação para o anticorpo SB-5 (A e E em verde) e (B e F) respectivos contrastes de fase, (C e G) marcação para Condroitin Sulfato (vermelho), e (D e H)

sobreposição entre SB-5 (verde) e Condroitin Sulfato (vermelho). Não há zonas de colocalização entre as marcações. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

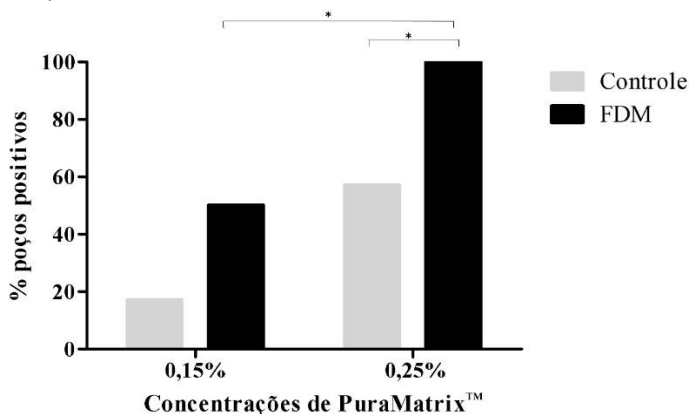
Figura 30- Análise da diferenciação de osteoblastos-osteocíticos em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,25%.



Imagens de microscopia de epifluorescência em culturas de 14 dias. (A) controle e (B) tratada com FDM revelando as marcações imunocitoquímicas para o anticorpo SB-5 para detecção de osteoblastos-osteocíticos (em verde). Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Os osteócitos foram identificados pela imunocitoquímica para SB-5, onde observou-se que na condição controle cerca de 20% dos poços de cultura em PuraMatrix™ 0,15% apresentaram diferenciação para este fenótipo (Figura 31). Na concentração de PuraMatrix™ 0,25% controle cerca de 60% dos poços apresentaram osteócitos. Sob tratamento com FDM, as concentrações de 0,15% e 0,25% de PuraMatrix™ exibiram 50% e 100% dos poços apresentando osteócitos, respectivamente (Figura 31). O aumento na frequência de aparecimento de osteoblastos entre estas condições também significativo. Na concentração de 0,25% este aumento foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (Figura 31).

Figura 31- Representação gráfica da frequência de poços positivos para osteoblastos-osteocíticos em culturas da CNT realizadas sobre as concentrações de 0,15 e 0,25% de PuraMatrix™.

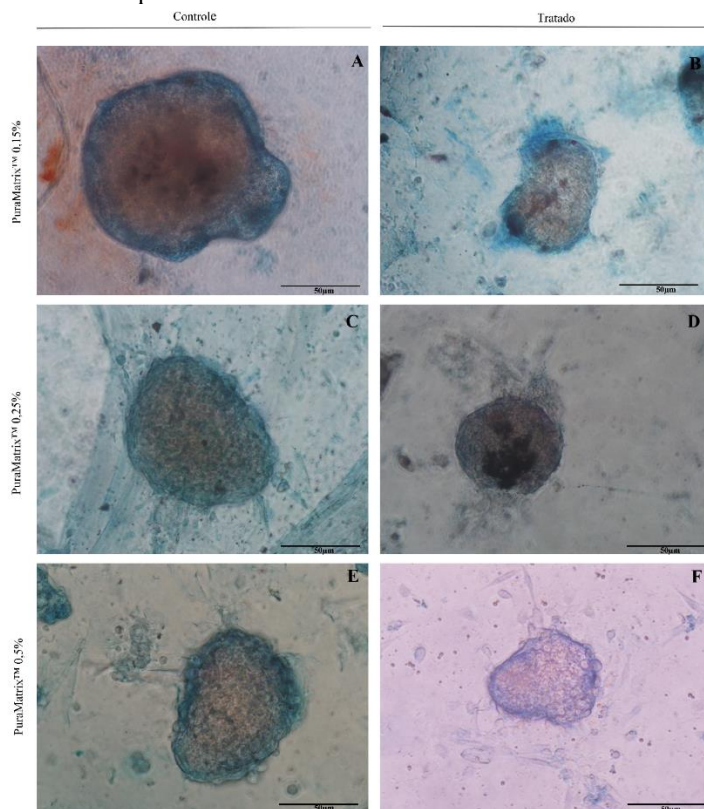


Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para osteoblastos-osteocíticos detectados através da expressão de SB5 em culturas da CNT realizadas sobre duas concentrações de PuraMatrix™. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para osteoblastos em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para osteoblastos em culturas tratadas com FDM. (n= 7 para as condições de PuraMatrix™ 0,25% de dois experimentos independentes e n=12 para a condições de PuraMatrix™ 0,15% de quatro experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

Para as colorações feitas em culturas de 14 dias em PuraMatrix™ 0,15%, 0,25% e 0,5%, não houveram marcações para matriz óssea com Vermelho de alizarina (Sigma®) (Figura 32) nem para Alcalina Fosfatase (Sigma®) (Figura 33).

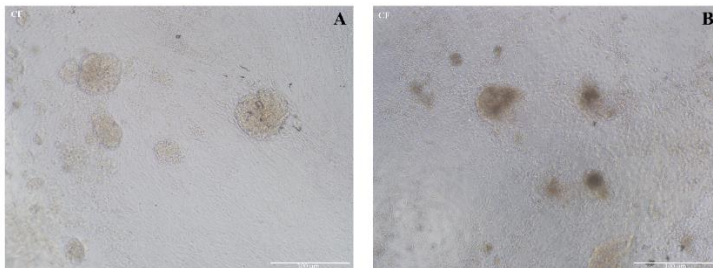


Figura 32- Análise da diferenciação osteogênica através da coloração de matriz mineralizada por Vermelho de alizarina em 14 dias.



Imagens de microscopia de contraste de fase exibindo nódulos marcados com Azul de alcian para detecção de glicosaminoglicanos em cartilagens (azul) e ausência de marcação para Vermelho de alizarina em 14 dias de cultura. (A) PuraMatrix™ 0,15% controle e (B) tratado; (C) PuraMatrix™ 0,25% controle e (D) tratado e (E) PuraMatrix™ 0,5% controle e (F) tratado. Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Figura 33- Análise da diferenciação osteogênica através da expressão de ALP em 14 dias.

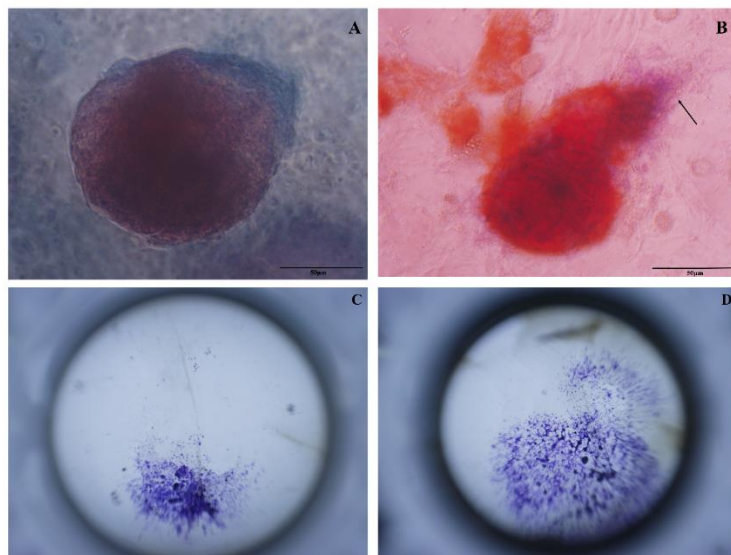


Imagens de microscopia de contraste de fase sem marcações para ALP em 14 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15% na situação (A) controle e (B) tratado. Aumento de 10x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

#### 4.3.7.2. Análises de osteócitos em 21 dias de cultura

Para compreender se tempo de cultivo de células da CNT sobre PuraMatrix™ poderia influenciar no número e/ou na diferenciação (maturação) do fenótipo ósseo, o tempo de cultura foi aumentado para 21 dias em PuraMatrix™ 0,15% (ver Materiais e Métodos). Neste tempo de cultura, foram observadas marcações para Vermelho de alizarina e Fosfatase Alcalina (ALP) em ambas situações controle e tratado com FDM. Na condição de tratamento com os FDM mais células estavam marcadas e com mais poços do que para controle (Figura 34). Contudo, devemos ressaltar que apesar de terem sido plaqueadas apenas 50 células por poço para culturas de 21 dias, em alguns poços ocorreu um descolamento de células dos poços. Isto prejudicou as análises de marcações.

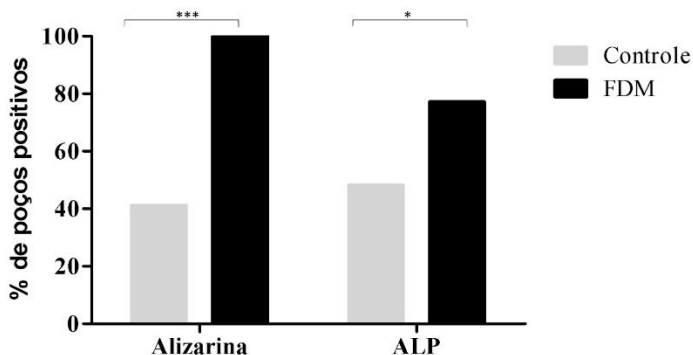
Figura 34- Análise da diferenciação de osteócitos através da coloração para Vermelho de alizarina e ALP em culturas de 21 dias em PuraMatrix™ 0,15%.



Imagens de microscopia de contraste de fase em culturas de 21 dias exibindo nódulos corados com Azul de alcian (em azul em A e indicado pela seta preta em B) e com Vermelho de alizarina (em vermelho) para (A) controle e (B) tratada (aumento de 40x) e células marcadas para ALP em (C) controle e (D) tratado com FDM. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Na situação controle, os osteócitos identificados pelas colorações de Vermelho de alizarina e ALP, estiveram presentes em 41% e 48% dos poços, respectivamente. Na situação tratado com FDMs houve um aumento na porcentagem de poços, para 100% e 77% dos poços, respectivamente. O aumento na frequência de aparecimento de osteócitos para a situação tratado com FDMs identificados pela coloração de Vermelho de alizarina foi significativo (Figura 35).

Figura 35- Representação gráfica da frequência de poços positivos para osteócitos identificados pela coloração de Vermelho de alizarina e ALP em culturas da CNT realizadas sobre a concentração de PuraMatrix™ 0,15%.

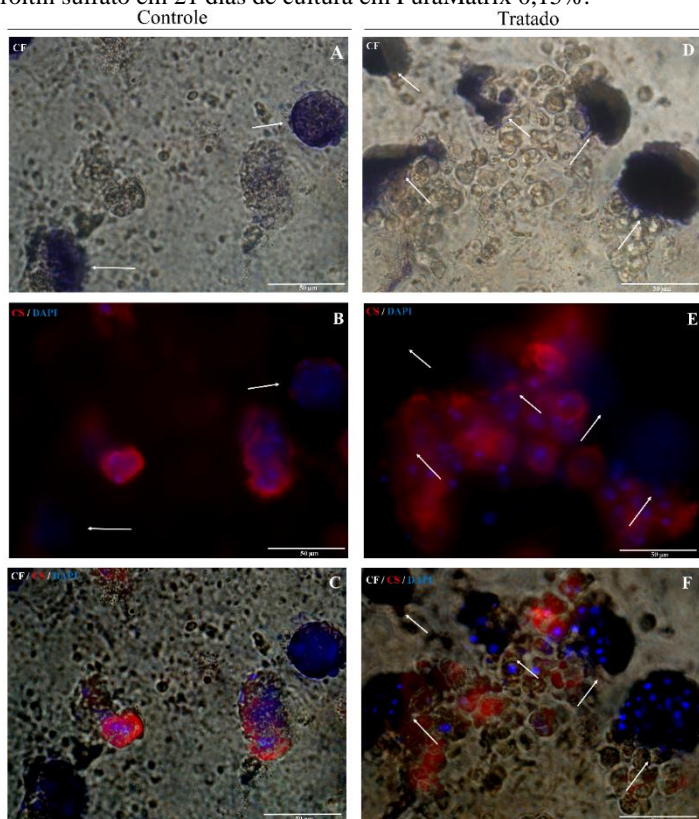


#### PuraMatrix™ 0,15%

Representação gráfica da frequência de poços com células diferenciadas para osteócitos identificados pela marcação de Vermelho de alizarina e ALP em culturas da CNT realizadas sobre PuraMatrix™ 0,15% por 21 dias. As barras em cinza mostram a porcentagem de poços positivos para osteócitos em culturas controles e as barras em preto mostram a porcentagem de poços positivos para osteócitos em culturas tratadas com FDM. (Para a condição controle, n= 23 para a coloração de Vermelho de Alizarina e n=17 para a coloração de ALP, de quatro experimentos independentes. Para a condição tratado, n= 19 para a coloração de Vermelho de alizarina e n= 22 para a coloração para ALP, de quatro experimentos independentes. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Fonte: produzida pelo autor (2016).

Em ambas situações com marcações para ALP, também foi realizada imunocitoquímica para condroitin sulfato com o objetivo de detectar condrócitos. Não houve sobreposição entre a marcação de ALP com condroitin sulfato, evidenciando que a ALP se trata de um bom marcador para discernir o fenótipo ósseo do cartilaginoso em culturas de 21 dias da CNT (Figura 36 C e F).

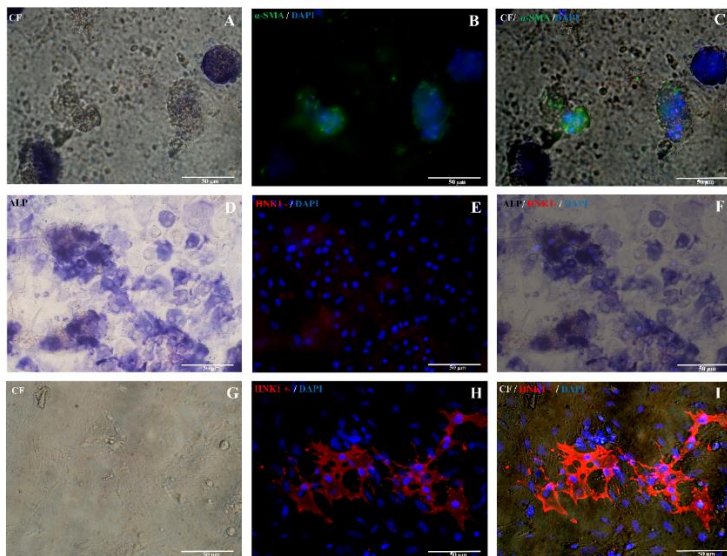
Figura 36- Análise de osteócitos por coloração de ALP e condrócitos com Condroitín sulfato em 21 dias de cultura em PuraMatrix 0,15%.



Imagens de microscopia de epifluorescência revelando as reações imunocitoquímicas através do anticorpo anti-Condroitín Sulfato para detecção de glicosaminoglicanos em cartilagens (em vermelho) e coloração para identificar ALP em culturas de 21 dias nas condições controle e tratado com FDM. (A) Coloração para ALP na situação controle (identificado por setas brancas), (B) mesmo campo mostrado em (A) evidenciando a marcação por imunocitoquímica para Condroitín Sulfato e (C) sobreposição entre ALP e Condroitín Sulfato (D) coloração para ALP na situação tratado (identificado pelas setas brancas), (E) marcação para Condroitín Sulfato e (F) sobreposição entre ALP com Condroitín Sulfato. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

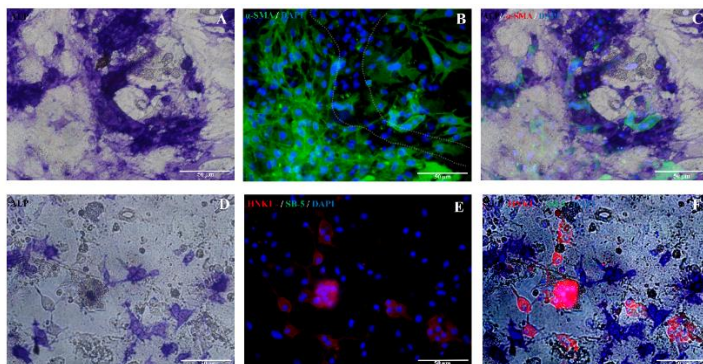
Em alguns casos de coloração para ALP em controle e tratado com FDM, a marcação ocorreu em células com formato fibroblástico (Figura 37 D e Figura 38 A, D). Desta forma, com o intuito de verificar se a ALP poderia estar sendo expressa por outros tipos celulares da CN para além do osteocítico, foram realizadas reações de imunocitoquímica para identificação de células musculares lisas e para células gliais. Contudo, as marcações para células musculares lisas (SMA<sup>+</sup>) e ALP não apresentaram sobreposição (Figura 37 C para controle e Figura 38 C para tratado) e tão pouco ocorreu sobreposição na marcação de células gliais (HNK1<sup>+</sup>) com ALP (Figura 37 F e I para controle e Figura 38 F para tratado).

Figura 37- Coloração para ALP e imunocitoquímica para células gliais e células musculares lisas em culturas da CNT controles de 21 dias.



Imagens de microscopia de contraste de fase e epifluorescência revelando as reações de imunocitoquímicas em culturas de 21 dias sobre PuraMatrix 0,15% na situação controle. (A) Nódulos marcados com coloração para ALP, (B) marcação para músculo liso e (C) sobreposição de contraste de fase com marcação para músculo liso; (D) coloração para ALP em células fibroblásticas; (E) marcação negativa para células gliais e (F) sobreposição de ALP com campo de marcações negativas para células gliais; (G) contraste de fase sem marcação para ALP; (H) marcação para HNK1 (em vermelho) e (I) sobreposição de contraste de fase com marcação para HNK1. Núcleos celulares foram detectada através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

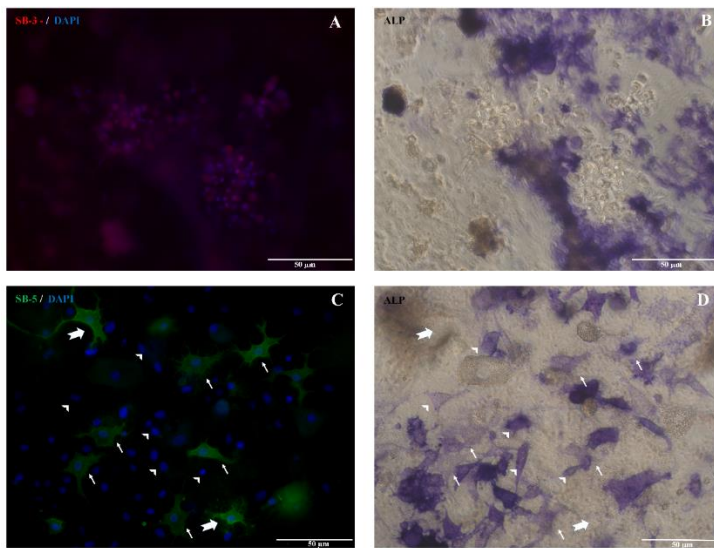
Figura 38- Coloração para ALP e imunocitoquímica para células gliais e células musculares lisas em culturas da CNT tratadas com FDM de 21 dias.



Imagens de microscopia de contraste de fase e epifluorescência revelando as reações de imunocitoquímicas em culturas de 21 dias sobre PuraMatrix™ 0,15% na situação tratado com FDM. (A) Células marcadas com coloração para ALP, (B) marcação para músculo liso e (C) sobreposição de contraste de fase com marcação para músculo liso; (D) coloração para ALP em células fibroblásticas; (E) marcação para HNK1 (em vermelho) e (I) sobreposição de contraste de fase com marcação para HNK1. Núcleos celulares detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Em 21 dias, não houve marcação para SB-3 (Figura 39A e B). Para culturas tratadas com FDM algumas células apresentaram uma dupla marcação para SB-5 e ALP (Figura 39C e D, evidenciado pelas setas brancas finas) enquanto outras células apresentam apenas marcação para SB-5 (Figura 39 C, evidenciado pelas setas brancas largas) ou apenas marcação para ALP (Figura 39 D, evidenciado pela ponta de flecha).

Figura 39- Marcações para SB-3 e SB-5 em 21 dias de cultura em PuraMatrix™ 0,15% tratadas com FDM.



Imagens de microscopia de epifluorescência em culturas de 21 dias tratadas com FDM revelando as reações imunocitoquímicas para a detecção de osteoblastos e osteócitos. (A) SB-3 negativo para detecção de osteoblastos (em vermelho) e (B) respectivo contraste de fase com marcação para ALP, (C) marcação para osteócitos com SB-5 (verde) e (D) respectivo contraste de fase com marcação para ALP. Setas brancas finas indicam células sobrepostas com ambas as marcações SB-5 e ALP e setas brancas largas indicam célula marcada apenas com SB5 (C) e pontas de flechas indicam células marcadas apenas com ALP (D), sem sobreposição. Os núcleos celulares foram detectados através da coloração com DAPI (em azul). Aumento de 40x. Fonte: produzida pelo autor (2016).

A tabela a seguir, traz um resumo dos resultados encontrados para a frequência de poços positivos para cada fenótipo analisado e a análise quantitativa para as três concentrações de PuraMatrix™ analisadas.



Tabela 3- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,15%.

PuraMatrix™ 0,15%														
Tipo celular	Glia		Neurônio		Melanócito		Músculo Liso		Adipócito		Condrócito		Osteócito	
Condição	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Frequência de poços	92%	50%	81%	96%	100%	100%	85%	100%	36%	100%	89%	89%	17%	50%
Quantidade	+	+	+	+	+	+	+++	++	+	++	+	++	NR	NR

Pequeno (+), médio (++) , grande (+++) e grande quantidade (++++). (n= 28 para controle e tratado para identificação de melanócitos, n=26 para a condição controle e n= 28 para condição tratado para os demais fenótipo, de quatro experimentos. Para o fenótipo osteocítico n=12 para o controle e tratado de quatro experimentos independentes. C: controle, T tratado, NR: não realizado. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Tabela 4- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,25%.

PuraMatrix™ 0,25%														
Tipo celular	Glia		Neurônio		Melanócito		Músculo Liso		Adipócito		Condrócito		Osteócito	
Condição	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Frequência de poços	92%	75%	69%	89%	100%	100%	88%	93%	54%	100%	79%	75%	57%	100%
Quantidade	++	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	++	NR	NR

Pequeno (+), médio (++) , grande (+++) e grande quantidade (++++). (n= 28 para controle e tratado para identificação de melanócitos, n=26 para a condição controle e n= 28 para condição tratado para os demais fenótipo, de quatro experimentos independentes. Para o fenótipo osteocítico n= 7 em controle e tratado de dois experimentos independentes. C: controle, T tratado, NR: não realizado. Fonte: produzida pelo autor (2016).

Tabela 5- Resumo dos resultados encontrados para as frequências e quantidades dos fenótipos encontrados na concentração de PuraMatrix™ 0,5%.

PuraMatrix™ 0,5%														
Tipo celular	Glia		Neurônio		Melanócito		Músculo Liso		Adipócito		Condrócito		Osteócito	
Condição	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Frequência de poços	58%	25%	33%	61%	100%	100%	89%	53%	0%	100%	72%	53%	NR	NR
Quantidade	++	+	+	+ *	+	+	++	++	-	+	++	++	NR	NR

Pequeno (+), médio (++) , grande (+++) e grande quantidade (++++). (n=36 para as condições controle e tratado de 4 experimentos independentes para PuraMatrix 0,5%). C: controle, T tratado, NF não realizado.



## 5. DISCUSSÃO

A crista neural (CN) é uma estrutura formada na sua maioria por progenitores multipotentes e heterogêneos. As células da crista neural truncal (CNT) apresentam *in vivo* uma capacidade limitada de diferenciação. Estes progenitores originam células gliais, neurônios, células cromafins e melanócitos, mas são incapazes de dar origem a derivados mesectodermiais. Contudo, quando expostas à diferentes condições de cultivo, estas células apresentam a capacidade de originar condrócitos, osteócitos e adipócitos (MCGONELL; GRAHAM, 2002; CALLONI *et al.*, 2007; COELHO-AGUIAR, LE DOUARIN; DUPIN, 2013). Deste modo, os progenitores da CN apresentam capacidades latentes que quando estimuladas corretamente *in vitro*, permitem que essas células se diferenciem em fenótipos não encontrados *in vivo*. Este estímulo pode ocorrer pelo ambiente químico (fatores de crescimento, morfógenos, hormônios) e/ou pelo ambiente físico (matriz extracelular).

Calloni e colaboradores (2007) sugerem que a maioria ou toda a CN era originalmente composta por progenitores do tipo neural-mesenquimal. Estes progenitores altamente multipotentes seriam mais primitivos do que os progenitores exclusivamente neurais ou mesenquimais. Desta forma, grande parte das células progenitoras teriam a potencialidade de originar todos os tipos celulares da CN (CALLONI *et al.*, 2007; LE DOUARIN; CALLONI; DUPIN, 2009).

Um dos métodos para avaliar a potencialidade dos progenitores da CN, é através de análises clonais *in vitro*. Para isso, uma única célula progenitora da CN é plaqueada em um poço e, após dez dias, identifica-se quais os fenótipos gerados a partir desta única célula. A partir disso, constrói-se árvores hierárquicas de progenitores da CN, que corresponderiam a um esquema do modelo de segregação dos progenitores. Deste modo, está claro atualmente, que aproximadamente 60% dos progenitores da CN cefálica (CNC) são altamente multipotentes, ou seja, as células progenitoras apresentam a capacidade de dar origem a quatro, cinco ou até seis fenótipos diferentes.

A maioria dos estudos de multipotencialidade das células da CN foram realizados sobre uma monocamada de fibroblastos embrionários de camundongo (3T3). Estas monocamadas além de constituir um arcabouço (matriz), secretam fatores de crescimento ao meio permitindo que as células da CN, sobrevivam, proliferem e diferenciem. Até o momento, foram identificados 29 progenitores para a CNC (Figura 40, progenitores em branco e verde) (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Além

disso, o tratamento das células da CNC com Shh aumenta consideravelmente os progenitores com capacidades neuroectodermas (células gliais, neurônios e melanócitos) e mesectodermas (miofibroblastos, condrócitos e osteoblastos) ao mesmo tempo. A maioria dos progenitores com capacidade mesenquimal quando tratados com o morfógeno Shh geram condrócitos (CALLONI *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento sinérgico com Shh e FGF8 é capaz de aumentar ainda mais a quantidade de progenitores com potencialidade condrocítica (cerca de 80% dos progenitores) (Meline Coelho da Costa – comunicação pessoal). Estes resultados são o reflexo do grande número de progenitores presentes na CNC com a potencialidade de gerar cartilagem (CALLONI *et al.*, 2007) e osso (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009).

Na CNT, até o momento, 20 progenitores foram identificados (Figura 40, progenitores identificados em azul e verde). Os progenitores com maior multipotencialidade identificados para a CNT são no máximo tetrapotentes. A árvore hierárquica de progenitores da CNT foi construída a partir de quatro trabalhos com técnicas de cultivos diferentes, onde as células foram cultivadas sobre 3T3 ou colágeno, além da adição de Fatores de Diferenciação Mesenquimal – para osteócitos e adipócitos - ou do morfógeno Shh (para cartilagem) (TRENTIN *et al.*, 2004; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013) (Figura 40). Entre estes progenitores identificados para a CNT, também há progenitores com capacidades neuro-mesenquimais, mas em muito menor quantidade quando comparado à CNC, (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013). Vale salientar que apenas um progenitor capaz de originar cartilagem (progenitor GFC), foi identificado até o momento em culturas clonais da CNT tratadas com Shh (CALLONI *et al.*, 2007).

Quando comparamos a CNC com a CNT em relação aos progenitores identificados, vemos que há um maior número de progenitores identificados apenas na CNC (19 progenitores, em branco na Figura 40). Dez progenitores foram identificados apenas na CNT (em azul na Figura 40) e dez deles são comuns tanto para a CNC quanto para CNT (em verde na Figura 40).

Até o momento, o maior progenitor identificado na CN (identificado apenas na CNC) é hexapotente. Ele é capaz de dar origem a glia (G), neurônio (N), melanócitos (M), fibroblasto (F), cartilagem (C) e osso (O). Alguns dos progenitores identificados, demonstraram a capacidade de se autorenovarem em culturas clonais de células da CNC e da CNT (GM e GF). Já o progenitor GMF apresentou capacidade de



Como mencionado anteriormente, a árvore de progenitores da CNT foi construída com base em quatro diferentes trabalhos. Isso deve-se ao fato de que ainda não se identificou um ambiente capaz de permitir a expressão da plena potencialidade dos progenitores da CNT. Partindo-se desse pressuposto, se conseguíssemos estabelecer condições de cultivo suficientemente permissivas/índutivas, estas potencialidades latentes poderiam expressar-se plenamente.

A utilização de PuraMatrix™ como substrato para o cultivo de células da CNT nos permitiu obter todos os fenótipos neurais e mesenquimais diferenciados a partir de progenitores da CN. Ressaltamos que apesar de termos realizado apenas culturas de “massa” (50 e/ou 400 células/poço) no presente estudo, este é o primeiro passo para que futuramente vislumbremos a realização de culturas clonais da CNT sobre esta matriz. O presente trabalho abre a perspectiva futura de detecção de novos progenitores com as potencialidades neurais-mesenquimais latentes da CNT. Assim, vislumbramos que talvez a árvore hierárquica de progenitores da CNT poderia ser mais semelhante a árvore de progenitores atualmente descrita para a CNC. Em outras palavras, hipotetizamos que a potencialidade latente das células da CNT pode ser tão ampla quanto a dos progenitores da CNC. Bastaria encontrarmos as condições ambientais propícias para que estas potencialidades pudessem se manifestar. A matriz de PuraMatrix™, sobretudo nas concentrações de 0,15% e 0,25%, parece constituir um bom arcabouço para a continuidade e aprofundamento destes estudos.

Ressaltamos ainda que este é um trabalho inédito e que pelo nosso conhecimento esta é a primeira vez que células embrionárias e indiferenciadas da CN são cultivadas sobre PuraMatrix™. Por outro lado, alguns trabalhos já trazem a capacidade das três concentrações de PuraMatrix™ testadas aqui em suportar a adesão, proliferação e diferenciação de células gliais e neuronais. Por exemplo, Moradi e colaboradores (2012) demonstraram o cultivo de células gliais -células de Schwann fetais humanas- em PuraMatrix™ 0,25%. Neste trabalho, as células gliais apresentaram uma população viável após 2 dias de cultura celular, além de exibir níveis mais elevados de fixação no substrato em comparação ao grupo controle (células cultivadas sobre o plástico). Verificou-se ainda melhor viabilidade e sobrevivência em comparação ao grupo controle e às células de Schwann suplementadas com 20% de sacarose cultivadas sobre PuraMatrix™ 0,25%. Mesmo sem a adição de fatores solúveis ao meio ou de proteínas de adesão, o hidrogel de PuraMatrix™ 0,25% mostrou um aumento de 25% na população celular

em comparação com o grupo controle (MORADI *et al.*, 2012). Ylä-Outinen e colaboradores cultivaram células tronco embrionárias humanas- estimuladas com tratamento para a diferenciação glial. Neste trabalho, a concentração de PuraMatrix™ 0,25% também apresentou um maior aumento no número de células gliais (positivas para GFAP) quando comparado às concentrações de PuraMatrix™ 0,05%, 0,10%, 0,15%. Vale salientar que esta concentração também foi a melhor em permitir a diferenciação de células gliais em nosso trabalho.

Em relação ao fenótipo neural, o mesmo trabalho citado anteriormente de Ylä-Outinen e colaboradores, avaliou a diferenciação de neurônios sobre PuraMatrix™ a partir de células tronco embrionárias humanas. O grupo verificou que PuraMatrix™ 0,25% apresentou as menores porcentagens para o fenótipo neuronal - células positivas para MAP2 -, onde as concentrações mais baixas de PuraMatrix 0,10% e PuraMatrix™ 0,05% mostraram-se melhores (YLÄ-OUTINEN *et al.*, 2014). Nossos resultados também apontam que menores concentrações de PuraMatrix™ mostram-se melhores para a diferenciação de células neuronais, visto que a melhor condição para a diferenciação de células neuroadrenérgicas foi a concentração mais baixa analisada em nosso trabalho (PuraMatrix™ 0,15%).

Por outro lado, Shivachar (2008) constatou que a concentração de PuraMatrix™ 0,25% não se adequou para a técnica de cultura em gota de células neuronais e gliais retiradas do córtex de ratos. Talvez, pelo fato de ser uma matriz mais macia e frágil de manusear, não sendo possível avaliar como as células se comportariam nesta concentração. Já a matriz de PuraMatrix™ 0,5% proporcionou uma arquitetura 3D com um tamanho de poro grande o suficiente para os neurônios estenderem os dendritos e formarem sinapses. Vale ressaltar que neste experimento, a concentração de PuraMatrix™ 1% não proporcionou crescimentos celulares (SHIVACHAR, 2008), assim como também observamos em nosso trabalho.

Outro fenótipo proveniente de progenitores de células da CN, são os melanócitos, que são originados ao longo de todo eixo rostro-caudal do embrião. Neste trabalho, a quantidade de melanócitos bem como a porcentagem de poços com a presença de melanócitos não se alterou para as três concentrações analisadas e entre controle e tratado com FDM. Entretanto, a morfologia mostrou-se diferente. Nas concentrações mais baixas (0,15% e 0,25%), os melanócitos apresentavam-se mais ramificados, como já relatado para o ambiente tridimensional em Matrigel® (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). Na concentração de PuraMatrix™ 0,5%, a mais alta analisada, os melanócitos estavam mais

espraiados e com menos prolongamentos, como observado para o ambiente bidimensional em Matrigel® e em culturas sobre o plástico (KLEINMAN *et al.*, 1986; RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). As concentrações mais baixas de PuraMatrix™ apresentam poros maiores, e acreditamos que por esse motivo, as células melanocíticas tenham penetrado mais na matriz e prolongado mais seus filopódios. Na concentração de PuraMatrix™ 0,5%, os poros são menores, o que pode ter proporcionado um maior contato entre as células melanocíticas e a matriz tornando-as mais espraiadas.

Em nossa pesquisa pelo PubMed e *Google Scholar*, com as palavras de pesquisa “Melanocytes, PuraMatrix, RADA”, não encontramos artigos que tragam o cultivo de melanócitos ou linhagens melanocíticas sob esta matriz. Assim, esta é a primeira vez que melanócitos são cultivados sob PuraMatrix™. A possibilidade de cultivar melanócitos em PuraMatrix™ abre novas perspectivas para o estudo de melanomas, por exemplo.

Uma das grandes preocupações e objetivos do presente trabalho foi o de possibilitar/estimular o aparecimento de fenótipos mesenquimais a partir da CNT em função das potencialidades latentes já demonstradas em estudos anteriores (MC GONELL; GRAHAM, 2002; CALLONI *et al.*, 2007; COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013). Assim, aliamos a utilização de uma matriz pura (PuraMatrix™) com estímulos químicos (FDMs) para a diferenciação de fenótipos mesectodermis – adipócitos, condrócitos e osteócitos. Supreendentemente, obtivemos adipócitos, condrócitos e osteoblastos/osteócitos em culturas controles da CNT sobre PuraMatrix™. Ou seja, PuraMatrix™ *per se* é suficiente em permitir a expressão de potencialidades mesenquimais latentes da CNT. Portanto, o tratamento com FDM apenas acentuou este processo.

Como já exposto anteriormente nesta dissertação, uma melhor compreensão da capacidade de diferenciação *in vitro* das células da CN, ocorreu através do uso de uma monocamada de fibroblastos embrionários (células 3T3), por permitir a diferenciação para a maioria dos tipos celulares derivados da CN. Quando a quantidade de células 3T3 por poços de cultura passou de 12.000 células/poço para 24.000 células/poço, a quantidade de poços que apresentavam nódulos de cartilagem passou de 30% para 50% dos poços em culturas de células da CNC (CALLONI, 2007). Quando células da CNT foram cultivadas sobre estas mesmas monocamadas de 3T3 em alta densidade (24.000 células/poço), condrócitos também foram identificados em apenas 8 dias de cultivo (CALLONI *et al.*, 2007). Apenas um ambiente propício também pode



influenciar a diferenciação de células da CN para fenótipos mesectodermis. Em outro estudo também sobre 3T3, condrócitos puderam ser identificados em culturas de 15 dias de CNT somente com meio básico de cultivo (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013).

A presença de condrócitos também pôde ser detectada quando as células da CNT foram cultivadas sobre Matrigel® em 10 dias de cultivo (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). Neste caso, a quantidade de poços positivos para nódulos de cartilagem chegou a aproximadamente 80%, apresentando um aumento quando comparado com trabalhos anteriores, que traziam a presença de condrócitos em aproximadamente 40% dos poços (CALLONI *et al.*, 2007; RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). Contudo, nos dois casos citados acima, as matrizes de cultivos possuíam uma grande quantidade de fatores desconhecidos, que poderiam também ter influenciado a diferenciação condrocítica.

Acreditamos que apenas a matriz formada pelo PuraMatrix™ seria propícia à diferenciação de progenitores condrocíticos em nosso estudo, visto que este fenótipo também pode ser obtido em culturas com meio controle e sobre as três concentrações de PuraMatrix™. O PuraMatrix™ não contém componentes de MEC de cartilagem, mas a matriz formada pela auto-associação das nanofibras e, teor de água e tamanho de poro são semelhantes aos encontrados em cartilagem nativa (WANG *et al.*, 2010). Essa relação célula-matriz é essencial para os condrócitos proliferarem, diferenciarem e sobreviverem.

Outros trabalhos também mostraram bons resultados para o cultivo de condrócitos em PuraMatrix™. O cultivo de condrócitos auriculares e articulares do úmero em PuraMatrix™ 0,5% e PuraMatrix™ 0,25%, respectivamente, mostrou células viáveis e capazes de produzir colágenos e glicosaminoglicanos (WANG *et al.*, 2010; YAMAOKA *et al.*, 2006).

Em relação ao fenótipo osteocítico/osteoblástico, Coelho-Aguiar e colaboradores (2013), realizaram o cultivo de progenitores da CNT sobre 3T3. Após somente 5 dias de cultivo em meio controle foi detectada a expressão do fator de transcrição Runx2 (codificado pelo gene mestre da diferenciação osteogênica de mesmo nome). Em culturas tratadas com FDM, houve a presença de matriz óssea e de proteínas coll1a1 e osteocalcina entre 7-10 dias de cultivo. Entretanto, o mesmo não ocorreu em culturas controles sem a adição de FDMs (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013). A nossa matriz de estudo infelizmente não permite a fixação das células com metanol, não sendo possível a realização da técnica de hibridização *in situ* para detecção de Runx2. Ainda, o anticorpo que dispúnhamos para Runx2 apresentou muita

marcação em condrócitos quando realizamos imunohistoquímica de membros posteriores de codornas como controle positivo. Estes dados evidenciam que talvez este não seja o marcador ideal para linhagem osteocítica, ao menos no que diz respeito a expressão protéica. Por fim, a maioria dos anticorpos encontrados no mercado marca matriz de osteócitos maduros, e como trabalhamos com um curto tempo de cultura, queríamos identificar um marcador para osteoblastos e osteócitos imaturos -não-secretoras de matriz mineralizante. Em 14 dias de cultura, detectamos osteoblastos-osteocíticos (identificados pela marcação de imunocitoquímica para SB-5) em culturas tratadas com FDMs. Apesar de observado em menor quantidade, osteoblastos-osteocíticos também foram detectados na condição controle (Figura 29). A presença de matriz mineralizada somente pôde ser identificada aos 21 dias de cultivo, junto com a presença de ALP, tanto para controle como tratado com FDM (Figura 34). A marcação para Vermelho de alizarina ocorreu no centro de nódulos já corados por Azul de alcian na periferia (Figura 34A), e a marcação para ALP pode ser vista em células individuais (Figura 37D). Estes dados sugerem que em nossas culturas pode ter ocorrido o processo de ossificação endocondral (que necessita de um molde de cartilagem para os osteócitos maturarem) e intramembranosa (sem a necessidade do molde de cartilagem). Em 21 dias, também pode-se observar um aumento na quantidade de osteócitos identificados por SB-5 para a condição tratado com FDMs. Ainda, identificamos osteócitos com uma dupla marcação para SB-5 e ALP (Figura 39C e D). Acreditamos que conforme as células perdiam a expressão de SB-5 elas começavam a expressar ALP, sugerindo uma maturação de osteoblastos-osteocíticos para osteócitos. Deste modo, a matriz de PuraMatrix™ estaria permitindo a diferenciação de progenitores osteocíticos e a maturação de osteócitos nas nossas culturas, mesmo sem o estímulo de FDMs, onde estes fatores apenas acelerariam a maturação.

Já foi demonstrado que PuraMatrix™ suporta a diferenciação e maturação de osteócitos em outros modelos de estudo. Chen e colaboradores demonstraram a produção de matriz mineralizada em culturas de células tronco mesenquimais humanas isoladas da medula óssea, cultivadas em PuraMatrix™ 0,25% sem estímulos de diferenciação (CHEN *et al.*, 2013). Culturas em PuraMatrix™ 1% de células osteoblásticas imaturas (HMS0014) também apresentaram produção de ALP em controle e, em maior quantidade, quando tratado com fatores de diferenciação ósseo. Também foi observada a produção de osteocalcina e acúmulo de cálcio, os quais aumentavam com os fatores para

diferenciação óssea. Além disso, a produção de ALP, osteocalcina e acúmulo de cálcio apresentou aumento com o passar do tempo (Iwai *et al.*, 2012).

Como já mencionado, condrócitos e osteócitos são dois fenótipos mesectodermiais que não se originam *in vivo* a partir da CNT, mas que já foram identificados *in vitro*, tanto em culturas de massa quanto clonais da CNT. O intrigante aparecimento destes fenótipos em culturas da CNT é de grande relevância científica e tem trazido ideias e hipóteses surpreendentes no campo do desenvolvimento e da compreensão das potencialidades de células da CNT. Até o momento apenas um progenitor capaz de originar condrócitos foi identificado para a CNT (GFC) (CALLONI *et al.*, 2007), ao contrário da CNC que apresenta vários progenitores já identificados com esta potencialidade. Outros progenitores ainda poderão vir a ser identificados. A matriz de PuraMatrix™ nos suscita esta possibilidade, haja visto a quantidade de condrócitos identificados em nossas culturas em massa. Cerca de 90% dos poços de cultivo revestidos com PuraMatrix™ 0,15% apresentaram condrócitos. Supreendentemente, além de condrócitos, obtivemos também adipócitos e osteoblastos/osteócitos em culturas controles da CNT sobre PuraMatrix™. Ou seja, PuraMatrix™ *per se* é suficiente em permitir a expressão de potencialidades mesenquimais latentes da CNT.

McGonnell e Graham (2002) demonstraram pela primeira vez a capacidade das células da CNT em se diferenciarem em cartilagem e osso. Estes pesquisadores cultivaram as células da CNT sobre o plástico e as estimularam com FDM. Após 4-5 semanas as culturas celulares apresentaram marcações para condrócitos e osteócitos (MCGONNELL; GRAHAM, 2002). Abzahanov e colaboradores que também demonstraram as capacidades condrogênica e osteogênica da CNT sugerem que as células da CNT perdem ou sofrem uma *downregulation* da expressão de genes *Hox* em um subconjunto de células (ABZHANOV *et al.*, 2003). A ausência de genes *Hox* é um pré-requisito para a formação de elementos cartilaginosos e ósseos (CREUZET *et al.*, 2002). Talvez, o ambiente criado pelo PuraMatrix™ esteja permitindo ou mesmo promovendo uma *downregulation* dos genes *Hox* em progenitores da CNT. Esta é uma possibilidade interessante que poderia ser testada em futuros trabalhos do grupo. Além disso, as células da CN podem modular sua expressão de genes *Hox* quando cultivadas em outros ambientes (TRAINOR; KRUMLAUF, 2000; TRAINOR; KRUMLAUF, 2001). Muito recentemente, esta capacidade de diferenciação pelas células da CNT também foi demonstrada *in vivo*. Para isso, componentes do circuito

de transcrição específicos da CNC foram introduzidos nas células da CNT *in vivo* (SIMOES-COSTA; BRONNER, 2016).

Questões evolutivas saciarium a questão sobre estes resultados *in vitro*. Há 410-470 milhões de anos, viviam nos mares os peixes placodermos. Estes peixes apresentavam uma armadura ossificada na região do tronco, formada por dentina, originada da CN, e uma mandíbula formada por 3 ossos. Durante a evolução, houve a perda do exoesqueleto por vertebrados e o ganho do endoesqueleto formado pelo mesoderma. Atualmente as evidências estão apontando cada vez mais que os placodermos são antecedentes diretos dos peixes ósseos (GAI *et al.*, 2011).

Nesse sentido, a diferenciação de condrócitos e osteócitos, *in vitro*, a partir de células indiferenciadas da CNT parece ser possível graças ao despertar de um potencial evolutivo “adormecido”. Sabe-se atualmente que alguns peixes fósseis (subclasse Heterostraci) apresentavam coberturas de exoesqueleto pós-craniais, onde um dos principais compostos (dentina) é uma proteína de origem exclusiva de células da CN. Estes dados parecem evidenciar um potencial da CNT em originar condrócitos e osteócitos em vertebrados extintos. Este potencial foi perdido progressivamente com a aquisição de um endoesqueleto (SMITH; HALL, 1990; DONOGHUE; SANSOM, 2002).

Outro fenótipo mesenquimal que não é gerado *in vivo* pelas células da CNT são os adipócitos. Billon e colaboradores investigaram a origem de células adipocíticas durante o desenvolvimento embrionário. Neste estudo, os autores demonstraram que células da CNT cultivadas sobre o plástico com meios de diferenciação para estimular o fenótipo adipocítico, apresentaram adipócitos após 20 dias de cultivo em mais de 40% das culturas (BILLON *et al.*, 2008). Nosso trabalho também apresentou diferenciação para adipócitos em todos os poços das três concentrações analisadas quando submetidas ao tratamento com FDMs. Contudo, para as concentrações de PuraMatrix™ 0,15% e 0,25%, pode também ser observado a diferenciação para adipócitos sem o tratamento com FDMs. Este achado demonstra que apenas o cultivo dessas células em uma matriz adequada é capaz de instigar capacidades mesenquimais latentes das células da CNT. Coelho-Aguiar e colaboradores, demonstraram que mesmo sem a adição de FDM, as células da CNT apresentavam marcadores pré-adipocíticos PPAR $\gamma$  em 11 dias de cultura sobre colágeno, demonstrando a capacidade de progenitores da CNT em originar adipócitos. Entretanto, mostrou-se necessário a adição de FDMs

para a maturação adipogênica. (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013).

Frente a estas capacidades que os progenitores apresentavam *in vitro* com a adição de estímulos a diferenciação osteocítica e adipocítica (BILLON *et al.*, 2007; MCGONNELL; GRAHAM, 2002), Coelho-Aguiar e colaboradores (2013), realizaram análises clonais. A estes progenitores foram adicionados os FDMs (os mesmos utilizados neste trabalho) que estimularam a diferenciação osteogênica e adipogênica. Entretanto, este trabalho teve que ser realizado em dois ambientes diferentes: monocamadas de fibroblastos embrionários (3T3) e colágeno. Isto teve que ser feito por questões técnicas pois os fibroblastos quando tratados com os FDM diferenciaram-se também em adipócitos. Então o grupo teve de realizar parte dos ensaios clonogênicos sobre colágeno. (COELHO-AGUIAR; LE DOUARIN; DUPIN, 2013). O resultado deste trabalho foi uma árvore hierárquica com progenitores capazes de originar adipócitos ou osteócitos. Desta forma, até o momento não foi descrito a existência de progenitores com potencial adipogênico e osteogênicos ao mesmo tempo para progenitores da CN (Figura 40). Tendo em vista nossos resultados, acreditamos que com a matriz de PuraMatrix™, futuramente estes progenitores poderão ser identificados. Esta capacidade de diferenciação de células da CNT em adipócitos pode também ter sido perdida ao longo da evolução.

Moléculas de adesão celular e componentes da matriz extracelular podem modular as interações da célula com seu ambiente (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998). Pré-adipócitos submetidos a condições de diferenciação na presença de componentes de matriz extracelular, demonstraram sua influência na diferenciação adipocítica (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998). A modulação de componentes da matriz pode permitir mudanças na adesão entre célula-célula e remodelamento de componentes celulares. Estas mudanças podem providenciar instruções de um ambiente permissivo ou instrutivo às células, para a expressão de genes para a diferenciação adipocítica (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998).

Assim como para melanócitos, a literatura também não traz o cultivo de adipócitos ou diferenciação adipocítica a partir de células indiferenciadas sob PuraMatrix™, sendo esta a primeira vez que é demonstrado a capacidade de PuraMatrix™ suportar a diferenciação adipocítica.

Atualmente está cada vez mais evidente que propriedades físicas do meio extracelular, tais como topografia, elasticidade e dureza são capazes de modular a atividade gênica através de um processo chamado

mecanotransdução (DISCHER; MOONEY; ZANDSTRA, 2010). Recentemente sugerimos que ambientes 3D comparados a ambientes 2D de Matrigel, seriam responsáveis *per se* em estimular a diferenciação para o fenótipo condrogênico a partir de células indiferenciadas da CNT (RAMOS-HRYB *et al.*, 2013). A conexão: matrix extracelular-integrinas-citoesqueleto-nucleoesqueleto-DNA atualmente é evidente e a mecanotransdução tem demonstrado que as propriedades físicas do ambiente (maleabilidade, força, rigidez, elasticidade) são capazes de promover a ativação/repressão gênica (ENGLER *et al.*, 2006).

Sabe-se que a ligação das células da CN com moléculas de integrinas são necessárias para a adesão, migração e diferenciação de células da CN (ALFANDARI *et al.*, 2003; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; GOH; YANG; HYNES, 1997). O trabalho de Costa-Silva e colaboradores mostrou que progenitores da CNC e da CNT de aves e mamíferos quando colocados sobre matrizes de fibronectina diferenciam-se preferencialmente em células musculares lisas. O efeito parece ocorrer por um processo seletivo, ou seja, progenitores dotados com o potencial para dar origem a células musculares lisas sobrevivem quando colocados sobre a fibronectina (COSTA-SILVA *et al.*, 2009). A sequência de aminoácidos que permitem a ligação celular através de receptores de integrinas nas células (arginina-glicina-ácido aspártico) é muito semelhante a sequência de aminoácidos que forma o hidrogel de PuraMatrix™ (arginina-alanina-ácido aspártico) (ZHANG *et al.*, 1995; ZHANG; ZHAI; SPIRIO, 2005). Contudo, a hipótese de que esta é a maneira pela qual as células aderem à matriz de PuraMatrix™ não foi comprovada (ZHANG *et al.*, 1995; HOLMES *et al.*, 2000).

A expressão diferencial de integrinas por diferentes progenitores da CNT poderia talvez explicar alguns de nossos resultados neste sentido. Células musculares lisas também estiveram presentes em todas as concentrações e em ambas as condições em nosso trabalho, mostrando melhores resultados quando cultivadas sobre PuraMatrix™ 0,15%, tanto em controle quando em tratado com FDMs. A ligação dos progenitores da CN à matriz de PuraMatrix™ por integrinas pode ter influenciado a diferenciação para células musculares lisas. Em outros modelos de estudo (*in vivo*) PuraMatrix™ 0,5% aliado com progenitores cardíacos (cSa-1) mostrou bons resultados em suportar melhoras na função cardíaca pós infarto de miocárdio em ratos. Esta associação da matriz de PuraMatrix™ com progenitores cardíacos, diminuiu a área de infarto, aumentou o número de capilares nesta área e vasos positivos para SMA (marcador de

músculo liso) e diminuiu a morte celular de miocárdios (TOKUNAGA *et al.*, 2010).

Vale salientar que células musculares lisas constituem também um fenótipo mesenquimal e que não se encontra naturalmente *in vivo* na região do tronco do embrião de vertebrados (exceto de alguns raros no endoneuro). Por outro lado, células musculares lisas são obtidas sem grandes dificuldades a partir de cultivos da CNT.

Assim, demonstramos pela primeira vez a eficiência da utilização de PuraMatrix™ como uma matriz de cultivo para células da CNT. O desenvolvimento desta pesquisa manteve constantemente a perspectiva de desenvolver um ambiente que permitiria futuramente ensaios de clonagem e sub-clonagem. Estudos neste sentido são importantes na obtenção de novos conhecimentos relacionados aos mecanismos de diferenciação e potencialidade de progenitores multipotentes da CN. Sabendo-se que até o momento, raros foram os progenitores detectados na CN capazes de se autorenovarem, o presente estudo poderá fornecer as bases para a expansão e o reconhecimento da existência de novas e verdadeiras células tronco da CN.

Por fim, com base nos dados obtidos de clonagens celulares desenvolvidos até o momento, podemos hipotetizar o maior progenitor multipotente para a CN, capaz de originar glia, neurônio, melanócito, fibroblasto, condrócito, osteócito e adipócito (GNMFCOA). Este progenitor heptapotente hipotético estaria no topo da árvore hierárquica dos progenitores da CN. A existência deste progenitor é altamente provável de ser identificado na CNC e, PuraMatrix™ permitirá identificá-lo, quiçá, também a partir de células da CNT.





## 6 CONCLUSÃO

- Os marcadores SBs mostraram-se uma boa alternativa para a identificação de osteoblastos e osteócitos em culturas de CNT;
- Demonstrou-se pela primeira vez o cultivo de células da CNT em matrizes de PuraMatrix™, onde esta matriz mostra-se uma boa alternativa de cultivo por permitir a plena diferenciação de células da CNT;
- As concentrações mais baixas foram mais propícias às células, permitindo uma melhor adesão e/ou proliferação e diferenciação das células da CNT, além de estimularem capacidades latentes do potencial de diferenciação das células da CNT;
- A adição de FDM permitiram que as células da CNT diferenciassem em uma maior quantidade para os fenótipos adipocíticos e osteocíticos.



## **7 PERSPECTIVAS**

- Este trabalho abre novas perspectivas para identificação de novos progenitores da CN através de análises clonais sob PuraMatrix™;
- Análises moleculares que revelariam a relação célula-matriz na diferenciação de células da CNT torna-se possíveis devido a plena diferenciação de células da CNT sobre PuraMatrix™;
- Estes resultados trazem novas evidencias acerca dos processos evolutivos da CN.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALFANDARI, D. et al. Integrin  $\alpha 5\beta 1$  supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. **Developmental Biology**, v. 260, n. 2, p. 449–464, 2003.

ALLEN, P.; MELERO-MARTIN, J. B. Type I collagen, fibrin and Puramatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 4, n. 164, p. 1–18, 2011.

BAGGIOLINI, A. et al. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 314–322, 2015.

BD Biosciences Discovery Labware. **BD PuraMatrix Peptide Hydrogel**: Catalog No. 354250 Guidelines for Use For Research Use Only Not For Clinical, Diagnostic or Therapeutic Use. Disponível em: <[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)>. Acesso em 19 nov. 2014.

BETANCUR P, BRONNER-FRASER M, S.-S. T. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. v. 4, n. 164, p. 581–603, 2010.

BILLON, N. et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 12, p. 2283–92, 2007.

BILLON, N.; MONTEIRO, M. C.; DANI, C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 100, n. 10, p. 563–575, 2008.

BOKHARI, M. A. et al. The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel - PolyHIPE polymer hybrid material. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5198–5208, 2005.

BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. E. Cell lineage analysis reveals

multipotency of some avian neural crest cells. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 161–4, 1988.

BRONNER, M. Confetti clarifies controversy: Neural crest stem cells are multipotent. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 217–218, 2015.

BRUDER, S.P.; CAPLAN, A. I. Discrete stages within the osteogenic lineage are revealed by alterations in the cell surface architecture of embryonic bone cells. **Connective tissue research**. V. 20, p.73-79, 1989.

CALLONI, G. W. et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n. 104, p. 19879–84, 2007.

CALLONI, G.W. Estudos in vitro da influência do microambiente nas potencialidades mesenquimais dos progenitores da crista neural. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 8947–8952, 2009.

CHEN, J. et al. Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 5–6, p. 716–28, 2013.

CHRISTIANSEN, J. H.; COLES, E. G.; WILKINSON, D. G. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 719–724, 2000.

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

COSTA-SILVA, B. et al. Fibronectin promotes differentiation of neural

crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 6, p. 955–967, 2009.

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

CREUZET, S. et al. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. **Development**, v. 129, n. 18, p. 4301–4313, 2002.

DONOGHUE, P. C. J. e SANSOM, I. J. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. **Microsc. Res. Tech.**, v. 59, n. 5, p. 352–72, 2002.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. NIH Public Access. **Growth (Lakeland)**, v. 324, n. 5935, p. 1673–1677, 2010.

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; DOUARIN, N. M. LE. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. p. 1–12, 2010.

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

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, 2006.

ETCHEVERS, H. C. et al. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 7, p. 1059–1068, 2001.

GAI, Z. et al. Fossil jawless fish from China foreshadows early jawed vertebrate anatomy. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 324–327, 2011.

GOH, K. L.; YANG, J. T.; HYNES, R. O. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. **Development**

(Cambridge, England), v. 124, n. 21, p. 4309–4319, 1997.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 783–809, 1998.

HALL, B. K. Discovery. In HALL, B. K. **The neural crest in developmental and evolution**. Nova Scotia: Springer Science + Bussiness Media New York, 1999. p. 3-12.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J Morphol** n. 88, p. 4992, 1951.

HOLMES, T. C. et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6728–6733, 2000.

IWAI, Y. et al. A preliminary study of the dental implant therapy--initial osteogenesis of human mesenchymal stem (HMS0014) cells on titanium discs with different surface modifications. **Okajimas folia anatomica Japonica**, v. 88, n. 4, p. 133–140, 2012.

KASEMEIER-KULESA, J. C.; KULESA, P. M.; LEFCORT, F. Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. **Development** (Cambridge, England), v. 132, n. 2, p. 235–45, 2005.

KLEINMAN, H. K. et al. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**. v. 25, n. 2, p.312-18, 1986.

KÖNTGES, G.; LUMSDEN, A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. **Development** (Cambridge, England), v. 122, n. 10, p. 3229–42, 1996.

KRISPIN, S. et al. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. **Development** (Cambridge, England), v. 137, n. 4, p. 585–595, 2010.

LE DOUARIN, N. M. Particularites du noyau interphasique chez la caille japonaise (*coturnix coturnix japonica*). **Bulletin Biologique** p. 436-452, 1969.



LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 30, n. 1, p. 31–48, 1973.

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

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

LE LIÈVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 34, n. 1, p. 125–154, 1975.

MCGONNELL, I. M.; GRAHAM, A. Trunk neural crest has skeletogenic potential. **Current Biology**, v. 12, n. 9, p. 767–771, 2002.

MORADI, F. et al. BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 12, p. 2335–2348, 2012.

ORTINAU, S. et al. Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells. **Biomedical engineering online**, v. 9, n. 1, p. 70, 2010.

PLAT, J. B. **Ectodermic origin of cartilage of the head**. Anatomischer Anzeiger, v. 8506-09, 1893.

PERRIS, R. The extracellular matrix in neural crest-cell migration. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 1, p. 23–31, 1997.

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

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half

of the chick somite. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 90, n. 1, p. 437–55, 1985.

RUGGERI, P. et al. Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. **InTech**, DOI: 10.5772/55536. 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/neuroblastoma/neurotrophin-and-neurotrophin-receptor-involvement-in-human-neuroblastoma>. Acessado em: 21 de nov. 2016.

SERBEDZIJA, G. N.; FRASER, S. E.; BRONNER-FRASER, M. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. **Development (Cambridge, England)**, v. 108, n. 4, p. 605–12, abr. 1990.

SHIVACHAR, A C. Neuronal and Neural Stem Cell Biodegradable Peptide Hydrogel. **Topics in Tissue Engineering**, v. 4, 2008.

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

SIMOES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6293, p. 1570–3, 2016.

SMITH, M. M. e HALL, B. K. **Development and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues**. Biol. Ver. Camb. Philos. Soc., v. 65, n. 3, p. 277373, 1990.

TAKEI, J. 3-Dimensional Cell Culture Scaffold For Everyone: Drug Screening, Tissue Engineering and Cancer Biology. **AATEX Journal**, v. 11, n. 3, p. 170–176, 2006.

TEILLET M, KALCHEIM C, L. D. N. et al. Formation of the dorsal Root Ganglia in the Avian Embryo: Segmental Origina and Migratory Behavior of Neural Crest Progenitor Cells. **Developmental Biology**, v. 120, p. 329–347, 1987.

TOKUNAGA, M. et al. Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial

infarction. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 49, n. 6, p. 972–983, 2010.

TRAINOR, P. A.; KRUMLAUF, R. Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 116–24, 2000.

TRAINOR, P. A.; KRUMLAUF, R. Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 698–705, 2001.

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

WANG, Q. G. et al. The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profiles. **European Cells and Materials**, v. 19, p. 86–95, 2010.

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

YAMAOKA, H. et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78A, n. 1, p. 1–11, jul. 2006.

YLÄ-OUTINEN, L. et al. Three-dimensional growth matrix for human embryonic stem cell-derived neuronal cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 8, n. 3, p. 186–194, mar. 2014.

ZHANG, S. et al. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. **Biomaterials**, v. 16, n. 18, p. 1385–1393, 1995.

ZHANG, S. ; ZHAO, X. e SPIRIO, L. PuraMatrix : Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds. In : MA, P. X. e ELISSEEFF, Eds. **Scaffolding in Tissue Engineering**. Taylor & Francis. 2005. p. 218- 237.