

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS – PGN**

**EFEITO DO FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL  
TRUNCAL (CNT) DE CODORNAS *IN VITRO***

**DENISE AVANI BITTENCOURT**

FLORIANÓPOLIS, setembro de 2007.

**EFEITO DO FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL  
TRUNCAL (CNT) DE CODORNAS *IN VITRO***

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

FLORIANÓPOLIS, setembro de 2007.

**“EFEITO DO FGF2 NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL (CNT) DE CODORNAS *IN VITRO*”**

**DENISE AVANI BITTENCOURT**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

na área de Neurobiologia Celular e Molecular aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora

---

Andréa Gonçalves Trentin

Coordenador do Curso

---

Adair Roberto Soares dos Santos

Banca Examinadora

---

Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)

---

Yara Maria Rauh Muller (Membro)

---

Paulo Dias (Membro)

---

Márcio Alvarez da Silva (Suplente)

*“O futuro pertence àqueles que acreditam  
na beleza de seus sonhos”*

Eleanor Roosevelt

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha orientadora Andréa, pela oportunidade de trabalhar nesta área da neurociência, pelo apoio e incentivo que sempre estiveram presentes, pelas palavras sempre otimistas, pela generosidade na orientação e pela assertividade nos momentos difíceis.

Ao querido Giordano, que foi meu professor de bancada quando entrei no laboratório ensinando os passos para me tornar uma candidata a cientista, onde pude aprender lições valiosas para a minha carreira e minha vida.

A minha amiga Meline, que juntamente com o Giordano me ajudou em vários processos de aprendizagem no laboratório e em especial nos últimos meses de mestrado pela grande ajuda que fez com que eu chegasse até aqui.

Aos amigos do laboratório, que compartilharam idéias, fomentaram discussões e trouxeram alegrias nestes três anos e meio de estudos: Ricardo e Cláudia, pelas conversas, pelos esclarecimentos das minhas dúvidas freqüentes e pelo otimismo; Mari pela amizade e a ajuda quase sempre imediata aos meus questionamentos; Maria Cecília por dividir além da casa, momentos de alegrias e tristezas; e também à Talita, Fernanda, Ricardinho, Bruno, Suelen, Bianca, Bianka, Zucco, Gabriela, Rossana, New,

aos que não estão mais, Cynara, Marco, Élen, Íris, Mariana, Évelyn e Lisiane que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais Pedro Paulo e Maria das Dores, pelo amor, dedicação, cuidados, apoio em todos os momentos de minha vida. Por estarem sempre presentes mesmo longe e acreditarem imensamente no meu projeto de vida. Em especial a minha filha Carolina, pela espera incansada e por entender minha ausência quando troquei o seu carinho por livros. Amo todos vocês e agradeço sempre por existirem.

## RESUMO

As células da crista neural (CN) têm origem a partir das bordas entre a placa neural e a epiderme durante o processo de neurulação. Na neurulação estas células sofrem transição de fenótipo epitelial para mesenquimal tornando-se migratórias, onde se destinam a povoar vários órgãos e tecidos em desenvolvimento. As regiões povoadas pelas células da CN ao longo do eixo embrionário formam subdivisões: cranial, vagal, truncal e sacral e produzem uma enorme variedade de derivados, incluindo neurônios, células gliais, melanócitos, células endócrinas e glandulares além de tecidos esqueléticos e conjuntivos da cabeça e pescoço, além das meninges cerebrais. As células da crista neural truncal (CNT) são compostas de populações de precursores já determinados e células pluripotentes capazes de originar diversos fenótipos. O destino dos precursores pluripotentes vai depender de vários fatores e o microambiente nos sítios de migração exerce papel fundamental neste processo. Vários fatores de crescimento têm sido identificados como sendo capazes em direcionar progenitores multipotentes da CN inclusive da região truncal para específicos tipos celulares incluindo o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2). Nesse estudo, verificamos que o FGF2 aumenta a proliferação de células da CNT influenciando na divisão celular e direcionando estas células para um estágio mais indiferenciado, sendo este resultado mais evidente em concentrações de 10ng/mL. Em adição, o FGF2 estimula a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e pluripotentes da CNT mantendo-os indiferenciados. Ao mesmo tempo, este fator estimula programas de diferenciação celular para as linhagens glial e neuronal às expensas da diferenciação melanocítica e miofibroblástica, cuja diferenciação terminal só ocorre com a retirada de FGF2.

**Palavras-chave:** Crista Neural, Crista Neural Truncal, FGF2, codorna.

## ABSTRACT

The neural crest (CN) is originated at the edges between the neural plate and the epidermis during the neurulation. During this process, the NC cells undergo an epithelial-mesenchymal transition, become migratory, and populate many organs and tissues in development. The NC is classified in four subdivisions according to the embryonic axis: cranial, vagal, trunk and sacral. The NC cells produce an enormous variety of derivatives, including glial cells and neurons of the peripheral nervous system, melanocytes, endocrine and glandular cells in addition to the skeletal and connective tissue of the head and neck. The trunk NC cells (TNC) correspond to a mixed population of already defined precursors and pluripotent cells capable of originating diverse phenotypes. The fate of pluripotent precursors depends on the microenvironmental factor found in the migratory pathways and in the final destiny of these cells. Some growth factors have been identified directing multipotent TNC to specific cell phenotypes including the fibroblast growth factor 2 (FGF2). In this study, we verify that FGF2 increases the proliferation of TNC cells and maintains these cells in an undifferentiated state, being the most evident result obtained with concentrations of 10 ng/mL. In addition, FGF2 stimulates the renewal and proliferation of multipotent precursors. At the same time, the factor stimulates programs of cellular differentiation for glial cells and neurons at the expense of melanocytic and myofibroblastic differentiation, whose terminal differentiation only occurs with the FGF2 withdrawal.

**Keywords:** Neural crest, Truncal Neural Crest, FGF2, quail.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. Crista Neural .....	15
1.2. Formação da CN e Sinais Indutivos .....	17
1.3. Plasticidade da Crista Neural.....	17
1.4. Crista Neural Truncal .....	19
1.5. Fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF2).....	23
1.6. FGF2 e Crista Neural .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1. Objetivo Geral .....	26
2.2. Objetivos Específicos .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Animais .....	27
3.2. Culturas de Células da CNT de Codornas .....	27
3.2.1. Culturas Primárias .....	27
3.2.2. Culturas Secundárias .....	27
3.2.3. Culturas Terciárias .....	28
3.3. Clonagens Celulares.....	29
3.4. Análise Fenotípica e Imunocitoquímica .....	29
3.5. Análise da Proliferação Celular .....	31
3.6. Análise da Mortalidade Celular .....	32
3.7. Análise Estatística .....	32
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1. Migração e morfologia das células da CNT sob o efeito do FGF2 .....	33
4.2. Efeito do FGF2 na proliferação das células da CNT .....	33
4.3. O FGF2 influencia a diferenciação de células da CNT .....	34

<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	46

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Formação do tubo neural em embrião de galinha .....	15
<b>Figura 2:</b> Estruturas derivadas da CN. ....	16
<b>Figura 3:</b> Diagrama esquemático da migração das células da CNT.....	20
<b>Figura 4:</b> Modelo da segregação da linhagem celular na CN cranial (A) e truncal (B) .	21
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo da metodologia utilizada .....	28
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo da metodologia utilizada para Clonagens.....	29
<b>Figura 7:</b> Modelo de linhagens celulares na CN.....	37

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Tipos celulares e estruturas derivados da CN .....	15
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de Variância de uma Via
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BMP	Proteína morfogênica do Osso
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CN	Crista Neural
CNC	Crista Neural Cefálica
CNT	Crista Neural Truncal
CNRS	<i>Centre Nationale de la Recherche Scientifique - France</i>
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
ET3	Endotelina 3
EE	Extrato de Embrião
EGF	Fator de Crescimento de Epiderme
EDTA	Ácido etilanediamino tetra-acético
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Célula Glial
GGF	Fator de Crescimento Glial
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	N-[2-hidroximetil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
LNH	Laboratório de Neurologia e Hematologia Celular e Molecular
Ig	Imunoglobulina
MEC	Matriz Extracelular
MeIEM	Marcador Precoce de Melanócitos
PBS	Tampão Fosfato Salina
PBS Triton	PBS contendo 0,25% de Triton X100
PBS Tween	PBS contendo 0,05% de Tween 20
RA	Ácido Retinóico
SBF	Soro Bovino Fetal

SMA	Actina de Músculo Liso
SMP	<i>Schwann Myelin Protein</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
T3	3-3'-5 triiodo-L-thironina
TGF $\beta$ 1	Fator de Crescimento Transformador Beta 1
TNB	Tampão Tris/Cloreto de Sódio
TXRD	Vermelho do Texas

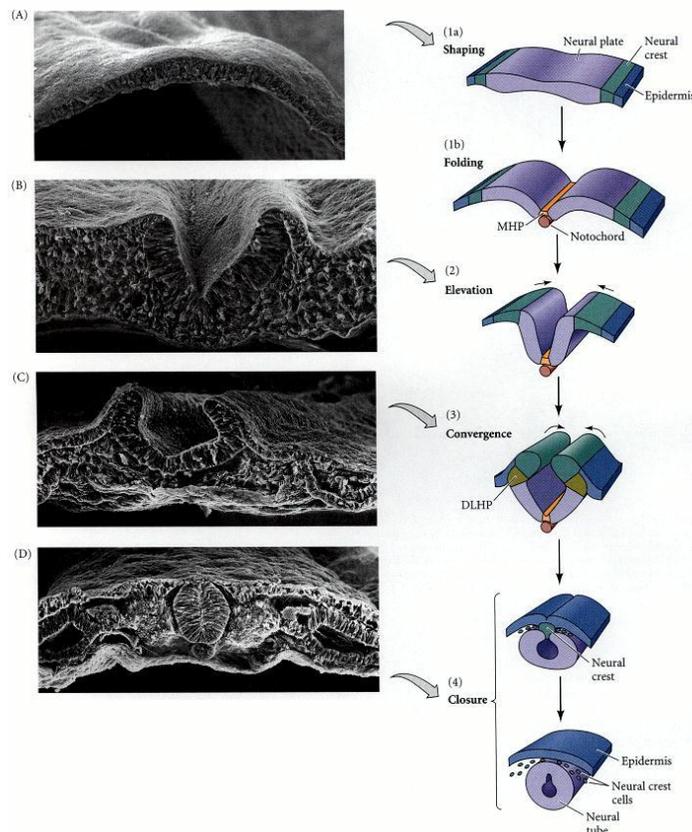
**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$^{\circ}$	Grau
%	Por cento
$\chi^2$	Ki quadrado
ng	Nanogramas
mg	Miligramas
<	Procedência menor

# 1. INTRODUÇÃO

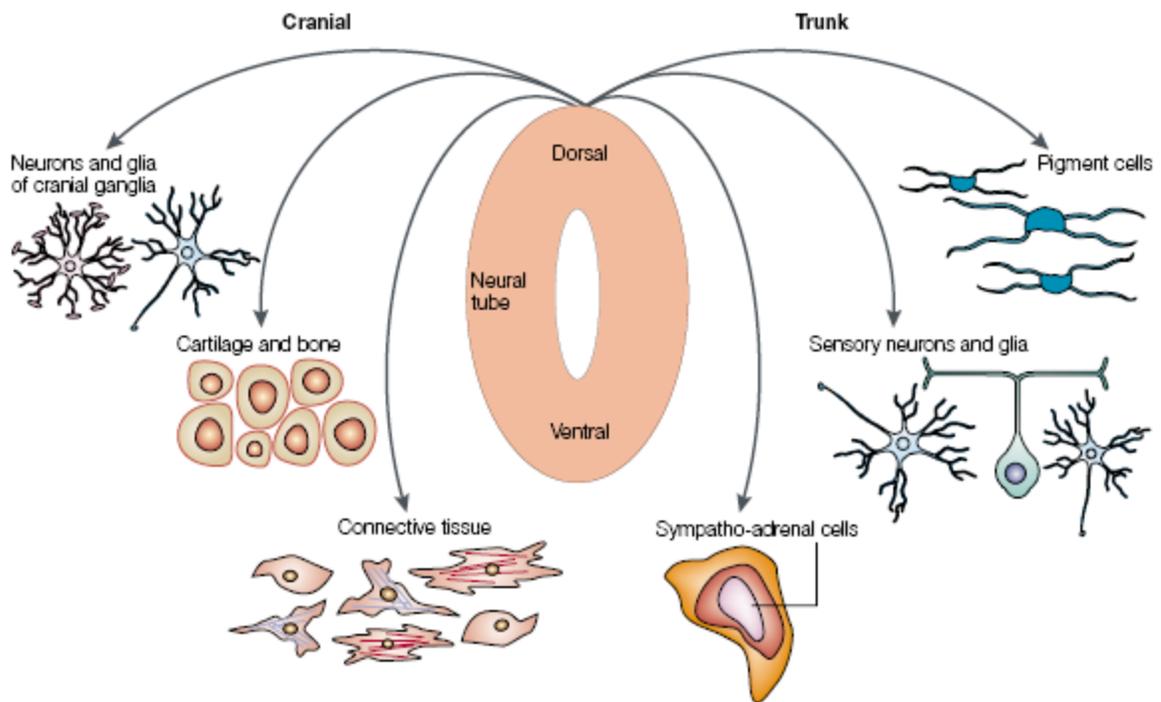
## 1.1. Crista Neural

A crista neural (CN) corresponde a uma população de células multipotentes altamente especializadas, presente em todos os embriões de vertebrados. A CN tem origem a partir da ectoderme, durante o processo da neurulação quando a placa neural se dobra em forma de V, e suas extremidades (as pregas neurais) se fundem formando o tubo neural o qual irá se diferenciar no sistema nervoso central (SNC). No momento em que ocorre o fechamento do tubo neural, as células localizadas das pregas neurais sofrem uma transição de fenótipo epitelial para o mesenquimal, tornando-se migratórias. As células da CN seguem então por caminhos migratórios distintos, e povoam vários órgãos e tecidos em desenvolvimento (figura 1) (para revisão ver LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999).



**Figura 1: Formação do tubo neural em embrião de galinha.** (A,1) As células da placa neural podem ser distinguidas como células alongadas na região dorsal da ectoderme. (B,2; C,3) A dobra neural eleva-se como epiderme presuntiva e continua a se mover em direção do dorso medial. (D4) As dobras neurais entram em contato uma com a outra, e as células da crista neural são especificadas nesta região. As células da crista neural então se dispersam e o tubo neural separa-se da epiderme. Adaptado de GILBERT (2000).

As rotas migratórias da CN variam quanto a sua posição de origem ao longo do eixo rostrocaudal embrionário formando subdivisões: cranial, vagal, truncal e sacral. Estas diferentes populações de células da CN seguem diversos caminhos de migração e produzem diferentes tipos celulares, incluindo neurônios autonômicos, sensoriais e entéricos do sistema nervoso periférico (SNP); células gliais (incluindo células de Schwann dos nervos periféricos, células satélites dos gânglios periféricos e glia entérica); melanócitos, e certos tipos de células endócrinas e glandulares. Em adição a estes fenótipos, a CN cranial produz os tecidos esquelético e conjuntivo da cabeça e pescoço, além das meninges cerebrais (figura 2) (para revisão ver LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; BAREMBAUM & BRONNER-FRASER, 2005).



**Figura 2: Estruturas derivadas da CN.** As células da CN migram por rotas específicas no embrião em desenvolvimento e se diferenciam em vários tipos celulares. Embora as células da CN sejam multipotentes, existem diferenças na sua potencialidade nos diferentes níveis antero-posteriores: as células da CNT formam melanócitos e vários tipos celulares neuronais e gliais, enquanto células da CN cranial (a região embrionária da cabeça) além deste, apresenta potencial de formar derivados mesenquimais, como cartilagem, ossos e tecidos conjuntivos. Adaptado de KNECHT & BRONNER-FRASER (2002).

## 1.2. Formação da CN e Sinais Indutivos

As células da CN têm sua origem na dobra do tubo neural através de interações da placa neural com a epiderme presuntiva. A completa indução desta população de células requer a transformação da ectoderme em CN através de um processo complexo que envolve vários passos de sinalização celular ao longo dos eixos médio-lateral e antero-posterior do embrião. Os sinais que posicionam as células da CN ao longo destes eixos são liberados pela placa neural, pela epiderme e pela mesoderme lateral. Estudos feitos em embriões de anfíbios indicam que a placa neural e a epiderme são especificadas por um aumento progressivo dos níveis da proteína morfogênica do osso (BMP). Embora a atividade de BMP seja requerida para a indução da CN em aves e anfíbios, esta molécula não é suficiente para induzir a formação da placa neural ou as células da CN. Um segundo grupo de sinais envolvidos na formação da CN são as moléculas Wnts, o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o ácido retinóico (RA) (BAREMBAUM & BRONNER – FRASER, 2005; STEVENTON *et al.*, 2005).

Para que as células da CN migrem, estas devem deixar seu local de origem, e neste momento diversas proteínas são requisitadas. Fortes evidências sugerem que a proteína RhoB pode estar envolvida na estabilização das condições do citoesqueleto que promovem a migração celular. Entretanto estas células não conseguem deixar o tubo neural se ainda estiverem conectadas umas as outras sendo que uma das funções da proteína Slug/Snail é ativar os fatores que dissociam as junções entre as células. Outro fator que está envolvido em iniciar a migração das células da CN é a perda da proteína N-caderina que mantém as células unidas. Esta proteína de adesão celular tem uma baixa expressão no momento da migração da CN. As células da CN truncal (CNT) não possuem N-caderina em sua superfície, que começam a ser expressas novamente na raiz dorsal e gânglios simpáticos (BRONNER-FRASER, 1992, para revisão ver LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999).

## 1.3. Plasticidade da Crista Neural

As células migratórias da CN são heterogêneas, consistindo de células pluripotentes, células que possuem potencial restrito, e de células que já estão comprometidas com um destino fenotípico particular podendo dar origem a uma variedade de tipos celulares em adultos (tabela 1).

**Tabela 1: Tipos celulares e estruturas derivados da CN**

Tipo Celular	Derivado
Neurônios	Sistema Nervoso Periférico (SNP): gânglios sensorial, simpático e entérico.
Células Gliais	Células gliais satélite do SNP e células de Schwann dos nervos periféricos.
Melanócitos	Células de pigmento da pele.
Células Endócrinas	Células produtoras de calcitonina da tireóide e células catecolaminérgicas da glândula adrenal.
Células Mesenquimais	Cartilagem, ossos, derme, tecidos dentário conjuntivo, muscular liso vascular e adiposo, glândulas e meninges da cabeça e pescoço.

Adaptado de DUPIN *et al.*, 2007.

Anderson (1989) descreveu a população de células da CN como um grupo de células tronco multipotentes, auto-renováveis e com potencialidade gradualmente restrita a sublinhagens em modelo de roedores. Estudos posteriores para investigar a plasticidade da CN em aves demonstraram que estas células têm características de células tronco sendo que, vários de seus derivados podem “transdiferenciar” em outros tipos celulares, ocorrendo assim desvio do estado da célula já diferenciado para um alternativo (SIEBER-BLUM, 1991). Estudos de clonagens de células de pigmento e seus progenitores demonstraram a capacidade de conversão fenotípica de células derivadas da CN de aves. Células gliais isoladas de nervo ciático são capazes de se converter em células de pigmento e vice-versa, gerando um tipo celular intermediário o qual expressa marcadores específicos de ambas as linhagens. Nos dois casos, a transição de fenótipo foi estimulada pela presença de endotelina 3 (ET3) e envolveu a reversão de células gliais e melanócitos para um estado bipotente Glia–Melanócito (GM). Estas investigações demonstram a plasticidade dos derivados da CN resultando eventualmente numa conversão de fenótipo entre as linhagens celulares devido à recuperação ou manutenção do potencial de diferenciação em resposta a fatores sinalizadores (DUPIN *et al.*, 2001; DUPIN *et al.*, 2003; REAL *et al.*, 2006).

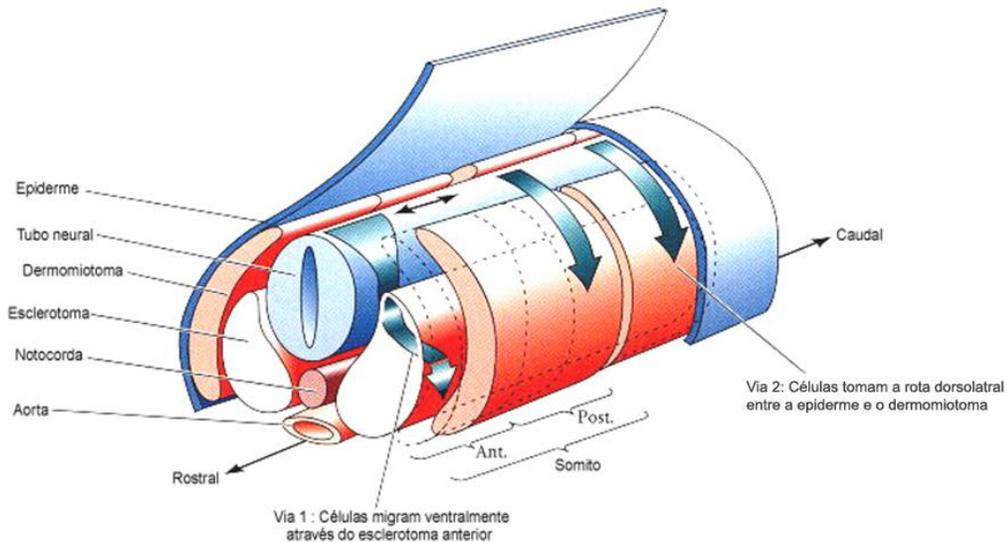
O microambiente em que as células se encontram é um fator importante que influencia a plasticidade celular. A combinação de sinais específicos em determinados períodos de tempo como também a sua localização, pode contribuir para aumentar a

potencialidade da CN (STEMPLE & ANDERSON, 1992; NICOLE *et al.*, 2004). Investigações em culturas de células da CN têm demonstrado que fatores de crescimento e de sobrevivência podem interferir no direcionamento do destino celular. Estes fatores, presentes nos sítios onde a célula da CN migra, são críticos na escolha da potencialidade. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) controla a migração de células da CN estimulando a sua diferenciação em neurônio sensorial em modelos de codorna (LE DOUARIN *et al.*, 1994). A proteína morfogenética de osso 2 e 4 (BMP2/4) pode direcionar as células da CN para um destino neural (SHAH *et al.*, 1996), os ligantes Notch/neuregulina favorecem a gliogênese (SHAH *et al.*, 1994) e ET3, promove a sobrevivência e proliferação de precursores bipotentes (GM) além da diferenciação em melanócitos e células gliais (DUPIN *et al.*, 2003).

#### **1.4. Crista Neural Truncal**

As células da CNT migram ao longo de dois caminhos distintos seguindo para localizações precisas no embrião (figura 3). O primeiro grupo de células migra ventralmente e origina neurônios sensoriais e simpáticos e células gliais. O segundo grupo de células migra mais tardiamente no sentido dorsolateral, originando os melanócitos da pele (HENION & WESTON, 1997; LE DOUARIN, 1999).

Graças a estudos *in vivo* e *in vitro* de células individuais, já está bem estabelecido que as células da CN tanto da região truncal quanto cranial de embriões, é inicialmente composta de duas populações principais: precursores já determinados e células pluripotentes capazes de originar diversos fenótipos. Barroffio e colaboradores (1991) obtiveram a primeira evidência da existência de precursores comuns entre linhagens neurais e mesectodermiais da CN cranial (CNC) com a identificação de um precursor pluripotente comum para neurônio, glia, melanócito e cartilagem. Recentemente, Trentin e colaboradores (2004) aprofundaram este estudo através de ensaios de clonagens e subclonagens celulares da CN de aves e demonstraram a existência de outros dois precursores altamente pluripotentes: o primeiro originando glia, melanócito, miofibroblasto e cartilagem (GMFC) (na região cefálica), e o segundo originando glia, neurônio, melanócito e miofibroblasto (GNMF) (identificado tanto na região cefálica, quanto truncal). Este estudo levantou a possibilidade da existência do progenitor de glia,

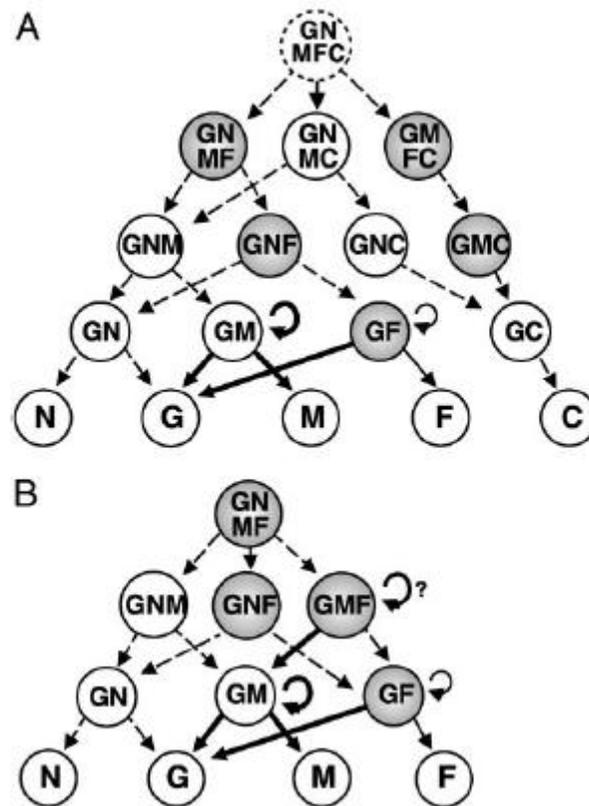


**Figura 3: Diagrama esquemático da migração das células da CNT.** Via 1 (caminho ventral): as células migram ventralmente através do esclerotoma anterior (a porção do somito que origina a cartilagem vertebral). Estas células inicialmente saem da porção posterior do esclerotoma migram ao longo do tubo neural indo para a região anterior oposta e contribuem para os gânglios simpáticos e parassimpáticos bem como, para células medulares adrenais e gânglios da rota dorsal. Pouco tempo depois outras células da CNT entram na Via 2 (o caminho dorsolateral) e migram ao longo da rota dorsolateral, abaixo da ectoderme e tornam-se melanócitos produtores de pigmentos. Adaptado de GILBERT (2003).

neurônio, melanócito, miofibroblasto e cartilagem (GNMFC) que seria a célula totipotente da CN, nunca descrita. Além disso, foi verificada a capacidade de auto-renovação dos progenitores bipotentes glia-melanócito (GM) e glia-miofibroblasto (GF), em ambas as regiões (figura 4). Devido a esta pluripotencialidade e capacidade de auto-renovação, as células da CN podem ser consideradas células-tronco (STEMPLE & ANDERSON, 1992; DUPIN & LE DOUARIN, 1995; MORRISON, 1999; LE DOUARIN *et al.*, 2004; TRENTIN *et al.*, 2004).

O destino dos precursores pluripotentes da CN vai depender de vários fatores, dentre eles a região de onde emergem (cranial, truncal ou caudal), as rotas migratórias adotadas e o local onde permanecerão. O microambiente dos sítios de migração e destino final exerce papel fundamental neste processo (LE DOUARIN, 1999; STEMPLE & ANDERSON, 1992; DUPIN & LE DOUARIN, 1995). Vários fatores de crescimento têm sido identificados em direcionar progenitores multipotentes da CN de ratos para tipos celulares específicos. Alguns destes fatores tais como, a proteína morfogenética do osso 2 (BMP2), o fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF) e o ácido retinóico (RA) estão envolvidos na diferenciação neuronal; o fator transformante  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) orienta as

células para o fenótipo de músculo liso; o fator de crescimento glial (GGF) promove a diferenciação glial; a endotelina 3 (ET3) é um potente mitógeno para as células da CN e orienta a diferenciação melanogêncica, o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), atua em vários tipos celulares da CN e está envolvido na diferenciação de cartilagem.



**Figura 4: Modelo da segregação da linhagem celular na CN cranial (A) e trunca (B).** Progenitores são classificados de acordo com o potencial de desenvolvimento e identificados por clonagens celulares. As células multipotentes da CN de codornas sofrem restrições progressivas em sua potencialidade com o desenvolvimento, produzindo precursores intermediários oligopotentes. A existência do progenitor GNMFC e as filiações (setas traçadas) são hipotéticas. Os precursores GM e GF comportam-se como células tronco. Precursores GF se auto-renovam independentemente da ET3 (setas curvadas), enquanto GM progenitores (e possivelmente GMF) possuem alta atividade de auto-renovação induzida pela ET3 (setas curvadas maiores). ET3 também promove a diferenciação GM em G e M e influencia o progenitor GF em direção ao destino glial (setas em negrito). (G) célula glial, (N) neurônio, (M) melanócito, (F) miofibroblasto, (C) cartilagem. Adaptado de TRENTIN *et al.* (2004).

Estes fatores geralmente estão localizados ao longo do caminho migratório ou nos sítios de diferenciação final das células da CN. Muitos fatores de crescimento agem instruindo as células multipotentes a formar os derivados específicos. Outros agem seletivamente, afetando a proliferação ou a sobrevivência de progenitores particulares (MURPHY *et al.*, 1994; DUPIN *et al.*, 2001; TRENTIN *et al.*, 2004).

Ao longo dos anos, estudos têm demonstrado através de culturas em massa e clonais, que a ET3 possui importante efeito no potencial de desenvolvimento das células da CN da região truncal promovendo a sua proliferação, inibindo a diferenciação terminal ou promovendo transdiferenciação quando direciona para diferentes fenótipos. Estes achados foram importantes para caracterizar as células da CNT, pelo seu comportamento, como células tronco, pois possuem a capacidade de reverter sua diferenciação final para outros fenótipos e desta forma podem mudar a sua programação (LAHAV *et al.*, 1996; REAL *et al.*, 2005).

A matriz extracelular (MEC) é outro fator responsável por promover o destino dos progenitores multipotentes da CN juntamente com os fatores de crescimento. A MEC é uma rede complexa de macromoléculas que preenche o espaço entre os tecidos. Dentre estas macromoléculas encontramos o colágeno, a fibronectina e a laminina, cuja organização é capaz de influenciar o citoesqueleto e o comportamento celular através da ligação de receptores de superfície que irão ativar várias vias intracelulares (ALBERTS *et al.*, 2006). Experimentos *in vivo*, demonstraram que, além de fatores de crescimento, as moléculas da MEC são encontradas no caminho migratório das células da CN e que influenciam na sua migração e diferenciação. As glicoproteínas que formam a MEC, como a fibronectina, colágenos e principalmente a laminina estão presentes nas membranas basais que circulam a região do epitélio no desenvolvimento do tubo neural, somitos, e ectoderme embrionária. A fibronectina desempenha um papel fundamental na mobilidade das células da CN e os colágenos tipos I e IV estão envolvidos na condução dos movimentos das células, onde possivelmente apontam o direcionamento na migração da CN. Os caminhos migratórios seguidos pelas populações celulares da CN (cranial e truncal) durante o desenvolvimento do embrião são distintos assim como seus derivados, e isso pode ser um reflexo também da MEC que neles se encontram (KROTOSKI *et al.*, 1986; PERRIS *et al.*, 1991; LALLIER *et al.*, 1992; PERRIS & PERISSINOTTO, 2000). Trabalhos recentes em laboratório revelaram que MEC controla a proliferação e diferenciação das células da CN de modo similar em aves e mamíferos (codornas e camundongos, respectivamente). Fibronectina estimula a diferenciação da CN para o fenótipo de miofibroblasto tanto na região cranial quanto truncal. Análises clonais de células da CNT mostraram que fibronectina induz ao aumento da proporção de progenitores unipotentes e oligopotentes com potencial para o desenvolvimento de

miofibroblastos se comparados com colágeno I. Estes resultados demonstraram que a fibronectina possui efeito instrutivo nas células da CN direcionando-as para um destino miofibroblástico sugerindo que este mecanismo é similar em modelos experimentais de codorna e camundongo em ambos os níveis cranial e truncal (COSTA, 2006; COSTA, 2007, submetido).

### **1.5. Fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF2)**

O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) compreende uma família de fatores contendo 23 membros, em mamíferos, com alta afinidade por heparina, e envolvidos em inúmeros processos do desenvolvimento. Originariamente a família FGF foi identificada como proteínas capazes de promover a proliferação de fibroblastos. Várias investigações posteriores mostraram que, além de afetar a proliferação, os membros desta família possuem a capacidade de influenciar a manutenção da plasticidade e modular a diferenciação de vários tipos celulares (CHIOU *et al.*, 2006; DAILEY *et al.*, 2005).

O FGF2 é considerado como um fator de crescimento multifuncional devido aos seus efeitos em diversas células e tecidos. Em vários estudos este polipeptídeo tem demonstrado atividade neurotrófica e parece ser um fator de sobrevivência que bloqueia a apoptose em células neuronais. Em adição a estas funções, o FGF2, atua como potente fator angiogênico, podendo estar envolvido na progressão tumoral e metástase. Modelos experimentais com a finalidade de determinar as funções do FGF2 *in vivo*, utilizando ratos neonatos “knock-out”, revelaram que estes animais são viáveis, férteis e são aparentemente normais. Entretanto, os ratos “knock-out” para FGF2 apresentam comprometimento neuronal principalmente no córtex, e pressão sanguínea reduzida, resultando em controle deficiente do reflexo neural e do tônus muscular (BASILICO & MOSCATELLI, 1992; DONO *et al.*, 1998).

Estudos sugerem ainda que FGF esteja envolvido na sinalização instrutiva das células durante o desenvolvimento embrionário. Todos os membros pertencentes à família FGF, inclusive o FGF2, podem se ligar em qualquer um dos quatro receptores RFGF1, RFGF2, RFGF3 e RFGF4 promovendo sinalização intracelular via tirosina-quinase. Os receptores de FGF (RFGF1-RFGF4) são proteínas de passagem transmembrana com atividade através da ligação ao domínio extracelular do receptor onde inicia o sinal da cascata de transdução que resulta na modificação do gene de

expressão. Dependendo do tipo celular ou estágio de maturação, produzem diversas respostas biológicas que incluem proliferação, crescimento, diferenciação celular ou apoptose (DAILEY *et al.*, 2005; TROKOVIC *et al.*, 2005).

### 1.6. FGF2 e Crista Neural

As células da CN expressam receptores de FGF. Níveis elevados de três dos quatro receptores de FGF (RFGF1, RFGF2 e RFGF3) são expressos nos progenitores da CN *in vivo* e *in vitro*, com particular intensidade no ápice do tubo neural onde a CN se forma. Somente o receptor RFGF4 não é expresso durante o desenvolvimento do tubo neural. Estudos realizados em culturas da CN proveniente dos níveis do prosencéfalo, mesencéfalo e do rombocéfalo demonstraram diferentes capacidades de diferenciação celular em resposta ao FGF2, mediadas por um ou mais receptores. Em adição, o FGF2 também atua como um fator de sobrevivência para sub-populações não neuronais e pode conduzir a diferenciação celular, promovendo a neurogênese em progenitores da CN em aves (KALCHEIM & NEUFELD, 1990; SHERMAN *et al.*, 1993; SAKAR, 2001; ESWARAKUMAR & SCHLESSINGER, 2005). Segundo Stocker (1991), progenitores bipotentes da CN podem existir transitoriamente durante a migração das células até o seu destino final e acredita-se que um dos fatores envolvidos na sobrevivência destas células é o fator FGF2.

Sarkar e colaboradores (2001) reportaram que a sobrevivência de células da CNC pré-migratórias foi estimulada por FGF2 sendo que o tipo de resposta depende de sua concentração. Desta forma, baixas concentrações de FGF2 (0.1 e 1ng/mL) apresentaram efeito proliferativo, e altas concentrações de FGF2 (10ng/mL) induziram a diferenciação esqueletogênica. Análises posteriores revelaram efeitos adicionais do FGF2 podendo em baixas concentrações atuar como mitógeno para células de Schwann em várias espécies de mamíferos.

Resultados das investigações apresentados por vários pesquisadores têm mostrado que o FGF2 pode regular o balanço dos efeitos de proliferação *versus* diferenciação de diversas regiões do embrião em diferentes estágios de desenvolvimento (ZHANG *et al.*; 1997; ABZHANOV *et al.*, 2003). Portanto, o caminho que a célula escolhe no momento da migração, no desenvolvimento do embrião, vai depender dos sinais recebidos ao seu redor, inclusive do FGF2. Estudos de investigação da

pluripotencialidade e plasticidade da CN confirmaram seu potencial de células tronco e está bem estabelecido que o microambiente apresenta um importante papel no direcionamento destas células tanto na região cranial como na trunca. Esta afirmação levanta a questão em analisar a função do FGF2 na determinação das células da CN, em especial das células da região trunca que é vista como uma região de alta potencialidade. Embora as células da CNT tenham sido amplamente investigadas, juntamente com vários fatores de crescimento com respostas no seu destino celular, a ação do FGF2 na potencialidade destas células ainda tem sido pouco compreendida (SHERMAN *et al.*, 1993; SARKAR *et al.*, 2001; ABZHANOV *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o efeito do FGF2 na proliferação, diferenciação, e potencialidade de células da crista neural da região truncal (CNT) de embriões de codornas, em cultura de células.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ❖ Analisar o efeito do FGF2 na migração, proliferação e morte celular das células da CNT;
- ❖ Verificar a ação do FGF2 na expressão fenotípica da CNT, analisando a proporção células gliais, neurônios, melanócitos e miofibroblastos em culturas de massa em diversas condições de cultivo;
- ❖ Avaliar a expressão de marcadores precoces de diferenciação celular (p75 e HNK1) nas células da CNT sob o efeito do FGF2 nas várias condições de cultura;
- ❖ Analisar a ação do FGF2 na potencialidade da CNT avaliando a ocorrência de progenitores pluripotentes e intermediários utilizando clonagens celulares.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados em média 30 embriões de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) por experimento, nos estágios de desenvolvimento de 18-25 somitos (estágios 15/16 HAMBURGUER & HAMILTON, 1951). Os ovos fecundados foram obtidos no biotério do laboratório de Neurobiologia e Hematobiologia Celular e Molecular (LNH) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal – UFSC, protocolo 338/CEUA e 23080.007342/2005-26/UFSC. O período de incubação dos ovos foi de 48 horas a 37,8°C em chocadeira com umidade relativa de 65%.

#### **3.2. Culturas de Células da CNT de Codornas**

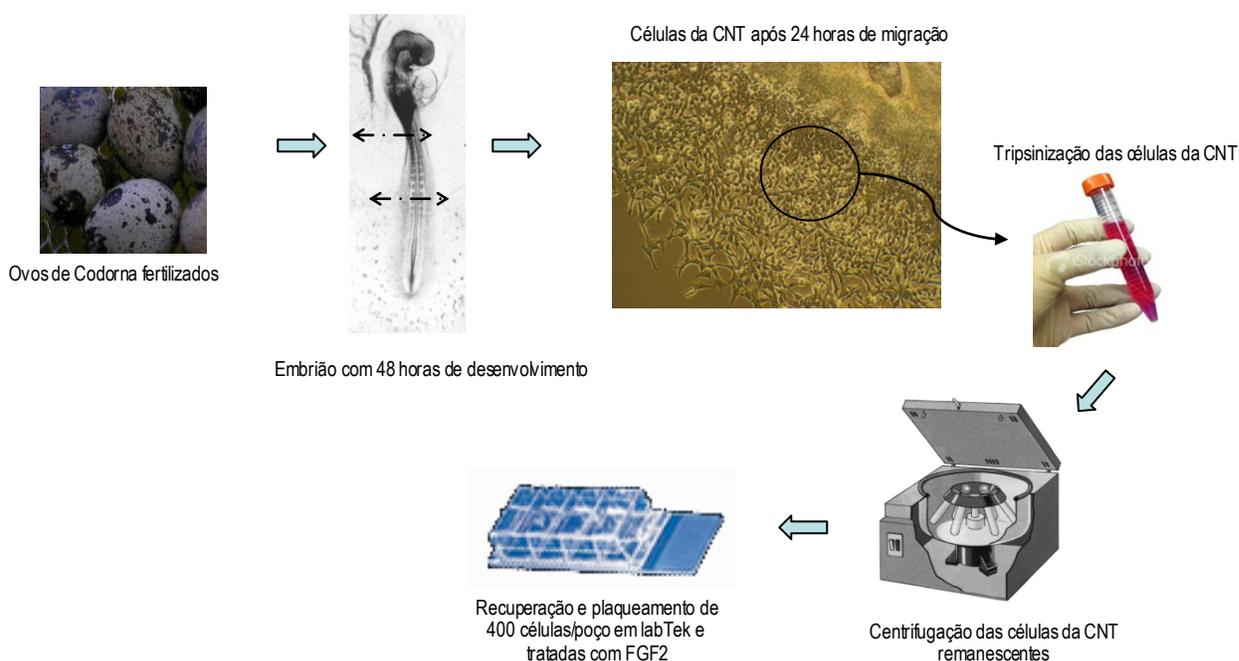
##### **3.2.1. Culturas Primárias**

As culturas primárias de células da CNT provenientes de embriões de codornas foram realizadas como descrito previamente por TRENTIN *et al.*, 2004, com algumas modificações. Inicialmente, foram isolados explantes de tubo neural da região trunca de embriões de codorna. Os explantes foram colocados em placas de cultura de 35mm (Corning) e mantidos em meio de cultura Mínimo Essencial Modificado Alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultlab) e 2% de extrato de embrião de galinha (EE) (Anexo I). A cultura foi crescida em estufa úmida à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico.

##### **3.2.2. Culturas Secundárias**

Após 24 horas de cultivo, os tubos neurais foram removidos e descartados e as células da CNT remanescentes foram descoladas com solução de tripsina a 0,25% (Sigma) e Ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,02% (EDTA, Vetec) em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 (Anexo II) e recuperadas através de bloqueio em meio contendo 10% SBF seguido de centrifugação (500 X g por 10 minutos).

Para a realização das culturas secundárias, foram semeadas 400 células por poço em placas do tipo Lab-Teks de plástico (Nunc) revestidas com colágeno I (20ug/mL) (Gibco) e mantidas com meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, 2% EE e acrescido de FGF2 (Sigma) em concentrações baixas (1ng/mL) e concentrações altas (10 e 20ng/mL) (figura 5). As culturas foram mantidas por 6 dias com trocas do meio de cultivo a cada 3 dias sendo a seguir fixadas e submetidas à análise fenotípica ou tripsinizadas e replaqueadas em culturas terciárias, como descrito a seguir.



**Figura 5: Esquema representativo da metodologia utilizada.** A figura ilustra as principais etapas para a realização das culturas primárias e secundárias da CNT.

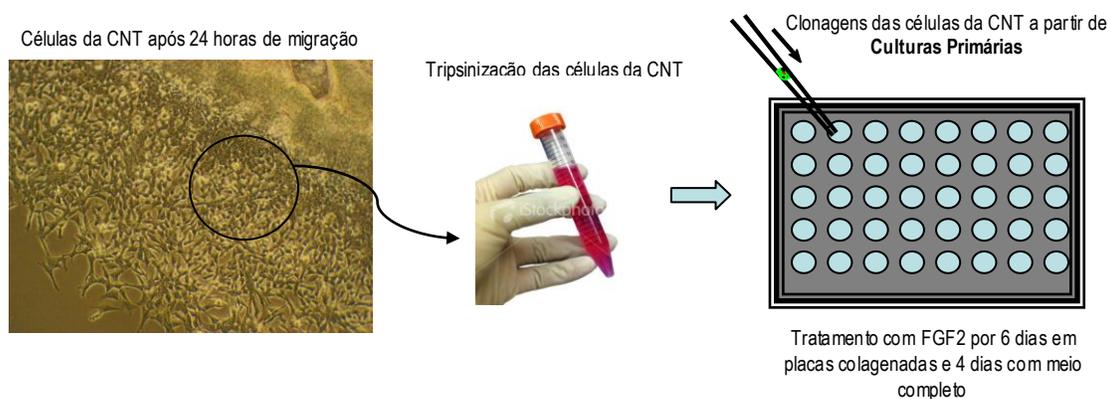
### 3.2.3. Culturas Terciárias

Para as culturas terciárias foram utilizadas monocamadas alimentadoras de fibroblasto embrionário 3T3-NIH (gentilmente doado pela Profa. Dra. Nicole Le Doaurin, CNRS, França) previamente tratadas com mitomicina (4ug/mL por 3h:30min) (Sigma) com o objetivo de bloquear a divisão celular. As células da CNT foram obtidas a partir das culturas secundárias descritas acima, e semeadas a uma densidade de 300 células por poço sobre monocamada de fibroblasto embrionário (Lab Tek). As culturas foram

mantidas por 6 dias com trocas do meio de cultura complexo:  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de SBF, 2% de EE e acrescido de hormônios e fatores de crescimento [transferrina (10mg/mL), hidrocortisona (0,1mg/mL), glucagon (0,01ng/mL), insulina (1ng/mL), T<sub>3</sub> (triiodotironina) (0,4ng/mL), EGF (fator de crescimento epidermal) (0,1ng/mL), FGF2 (1ng/mL)], em estufa úmida (95%) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico. Todos os hormônios e fatores de crescimentos foram adquiridos do fabricante Sigma.

### 3.3. Clonagens Celulares

As culturas clonais de células da CNT foram realizadas como descrito previamente por TRENTIN *et al.* (2004) para análise dos efeitos de FGF2 sobre a potencialidade dos progenitores da CN. Células da CNT foram semeadas individualmente sob controle microscópico em placas de 96 poços (Corning). Células provenientes da cultura primária foram clonadas sobre colágeno I e mantidas na presença ou não de FGF2 a 10ng/mL durante 6 dias e depois por mais 4 dias no meio complexo descrito acima (figura 6).



**Figura 6: Esquema representativo da metodologia utilizada para Clonagens.** As clonagens foram realizadas utilizando células provenientes de culturas primárias na presença de FGF2.

### 3.4. Análise Fenotípica e Imunocitoquímica

As culturas (secundárias, terciárias e culturas clonais) foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30min, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizada com PBS-Triton (0,3%) durante 20 min. A biotina endógena das células foi bloqueada com

tampão TNB (Tampão Tris/cloreto de sódio) por 20min para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida as células foram submetidas à reação imunocitoquímica utilizando-se marcadores celulares específicos para os diferentes fenótipos oriundos da CN (TRENTIN *et al.*, 2004). Embora os melanócitos possuam seu próprio marcador (a melanina) facilmente identificável em microscopia de contraste de fase, foi utilizado também, um anticorpo monoclonal de camundongo IgG1 anti-marcador precoce de melanócitos (Marcador precoce de Melanócito-Melanoblasto - MelEM) (gentilmente doado pela Profa. Dra. Nicole Le Douarin) o qual liga-se a células pré-melanocíticas (LAHAV *et al.*, 1998). As células gliais de cordão foram identificadas com o anticorpo de camundongo IgG1 anti-proteína miélica específico para célula de Schwann (*Schwann myelin protein* – SMP, 1:200. DULAC *et al.*, 1992) (gentilmente doado pela Profa. Dra. Nicole Le Douarin). Para o reconhecimento de células miofibroblásticas, foi utilizado um anticorpo de camundongo IgG2a anti-actina de músculo liso (SMA, 1:800, Sigma). Para identificar neurônios e células adrenérgicas, foram utilizados anticorpos de camundongo IgG1 anti- $\beta$ Tubulina III (marcador de neurônios, 1:200, Promega) e anti-tirosina hidroxilase (TyrOHase {TH} - células adrenérgicas, VINCENT & THIERY, 1984) (gentilmente doado pela Profa. Dra. Nicole Le Douarin). Foram utilizados ainda como marcadores precoces das células da CN, o receptor de baixa afinidade de neurotrofinas p75 (anticorpo IgG de coelho anti-p75) (1:100, Santa Cruz) e *Human Natural Killer* (anticorpo IgM de camundongo anti-HNK-1, 1:50 COULY *et al.*, 1993) (gentilmente doado pela Profa. Nicole Le Douarin). Foram utilizados os anticorpos secundários anti-IgG1 (1:100), IgG2a (1:75) ou IgM (1:100) de camundongo ou anti-IgG (1:100) de coelho ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC), Vermelho do Texas (TXRD) ou biotina (todos da Southern Biotechnology). Quando utilizados anticorpos secundários ligados a biotina, foram realizadas incubações posteriores com streptavidina (1:150), e tiramida (1:200) para amplificação da fluorescência com o kit de amplificação Tiramida (Tyramide Signal Amplification – TSA™ Fluorescein System, Perkin – Elmer) segundo orientações do fabricante. O núcleo das células foi visualizado com o corante fluorescente 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI -  $10^{-4}$  mg/mL) (Sigma) por 15 segundos a temperatura ambiente. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período de 1 hora a 37°C. A seguir procedeu-se às lavagens (3 lavagens de 5 minutos cada sob leve agitação com solução de PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween) (Sigma) e à nova

incubação (1 hora, a temperatura ambiente) com os anticorpos secundários. Após novas lavagens, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0) (Anexo III).

As marcações fluorescentes da expressão fenotípica dos derivados da CNT foram observadas, analisadas e documentadas sob microscópio epifluorescente (Olympus). Para culturas em massa, foram analisadas pelo menos 20 diferentes campos por condição de experimento em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas. As proporções da expressão dos marcadores específicos foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais, nas diferentes condições de culturas analisadas. As análises dos clones foram realizadas em 48 poços por experimento, sendo que em cada clone presente foi avaliada a expressão dos marcadores fenotípicos. A identidade do progenitor (célula fundadora da colônia) foi confirmada *a posteriori* pelo conjunto de fenótipos celulares presentes no clone.

### **3.5. Análise da Proliferação Celular**

A proliferação celular foi analisada pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Zymed) como descrito em MARTINEZ & GOMES (2005). O BrdU é um análogo da timidina que, quando acrescido ao meio de cultura é incorporado pelas células em divisão celular. As monocamadas celulares foram incubadas por um período de 2 horas com BrdU (1:100), sendo a seguir fixadas com 4% de paraformaldeído durante 30 min. As culturas foram lavadas com água destilada e incubadas em 2N de ácido clorídrico (HCl, F. Maia) a 50°C por 15 min por 2 vezes. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo IgG1 anti-BrdU (1:50). A reação de imunocitoquímica para revelação do BrdU foi realizada como descrito acima e as marcações dos derivados da CNT foram observadas, analisadas e documentadas sob microscópio epifluorescente (Olympus). Foram analisadas pelo menos 20 diferentes campos por condição de experimento em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas. As proporções da expressão do marcador específico (BrdU) foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais, nas diferentes condições de culturas analisadas. Os núcleos das células foram corados com DAPI.

### 3.6. Análise da Mortalidade Celular

O efeito sobre a mortalidade das culturas da CNT foi analisado por incorporação de SYTOX *Green* como descrito por AGUIAR *et al.*, 2002 com algumas modificações, e pela análise de núcleos apoptóticos como descrito por VILLEGAS *et al.*, 2006. O SYTOX *Green* corresponde a um marcador nuclear e cromossômico impermeável à membrana de células vivas e apoptóticas, mas marca células necróticas pela ligação aos ácidos nucléicos. As células da CNT foram lavadas duas vezes com tampão ácido (N-[2-hidroxi metil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES - 5mM/L) (Sigma) e incubadas com Sytox Green (1:100) (Molecular Probes) diluído em mesmo tampão durante 10 min., à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween) as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com o corante nuclear DAPI. Para os eventos que caracterizam a apoptose avaliamos os núcleos apoptóticos pela fragmentação da cromatina, através da utilização do corante DAPI que permite a visualização nuclear. As células da CNT foram cultivadas em placas de cultura em diferentes concentrações de FGF2 durante 6 dias. As lâminas para SYTOX *Green* e para a análise da apoptose foram montadas com glicerina tamponada (Anexo III) e as marcações fluorescentes foram analisadas e documentadas sob microscópio epifluorescente (Olympus). Foram analisadas pelo menos 20 diferentes campos por condição de experimento em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas e não marcadas (ou núcleos apoptóticos para análise da apoptose celular). As proporções da expressão do marcador específico para SYTOX *Green* foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais, nas diferentes condições de culturas analisadas. Do total de núcleos contados foi determinado o número de núcleos apoptóticos para quantificar a porcentagem de células em processo de morte celular.

### 3.7. Análise Estatística

A significância das diferenças foi avaliada por ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. A análise da proporção dos clones foi feita por  $\chi^2$ . Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico GraphPad Prism 4<sup>®</sup>.

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Migração e morfologia das células da CNT sob o efeito do FGF2**

No presente estudo demonstramos que durante o desenvolvimento e diferenciação das células da CNT, diferentes respostas fisiológicas resultam da interferência do fator de crescimento FGF2. As células da CN podem se multiplicar durante e depois da migração a partir do tubo neural. Células pluripotentes estão presentes não somente na CN migratória, mas também nos sítios de diferenciação final, incluindo pares de arcos branquiais posteriores, epiderme, gânglios simpáticos e gânglios da raiz dorsal (ZANG *et al.*, 1997). Em nosso modelo experimental, investigamos o efeito do fator de crescimento FGF2 em células da CNT de codornas através de culturas de células em massa e culturas clonais. Primeiramente analisamos a migração das células da CN da região truncal na presença de FGF2. Dados da literatura afirmam que a CN dos níveis cranial, truncal ou sacral possuem diferentes capacidades de diferenciação em resposta ao FGF2 (KALCHEIM & NEUFELD, 1990). Em nossos resultados observamos que o FGF2 não interfere na migração das células da CNT nas primeiras 24 horas de cultura primária. Embora Sarkar (2001) tenha relatado que a presença FGF2 durante o período inicial de cultura seja crucial para a resposta celular, em nossos experimentos não observamos diferença quanto o tratamento foi efetuado desde as primeiras 24 horas ou após esse período. As células da CNT apresentam morfologia fusiforme e alongada que não é alterada pelo fator.

### **4.2. Efeito do FGF2 na proliferação das células da CNT**

Em nosso modelo de estudo, verificamos que o fator de crescimento FGF2 promoveu aumento na proporção de células da CNT. As análises da morte celular através do marcador nuclear de células necróticas (SYTOX *Green*) e núcleos apoptóticos foram baixas em todas as condições experimentais. Apesar do valor máximo de morte celular analisado pelo SYTOX *Green* ser observado no controle, não houve diferença significativa para as culturas tratadas com FGF2. Efeito similar foi observado na análise da apoptose, sugerindo que o fator não esteja interferindo na sobrevivência destas células.

A investigação da proliferação celular foi avaliada pela incorporação de BrdU. Obtivemos um pico máximo de células BrdU positivas em culturas tratadas com 10ng/mL de FGF2 (em torno de 34,5%) mostrando que o FGF2 tem efeito específico na proliferação das células da CNT. Investigações sobre o efeito do FGF2 em células da CN têm mostrado que este fator é específico em estimular a divisão celular (MUPHY *et al.*, 1994). Estes resultados são consistentes com as observações em nosso trabalho mostrando que o FGF2 não interfere na sobrevivência das células da CNT, mas na sua proliferação.

#### **4.3. O FGF2 influencia a diferenciação de células da CNT**

As células da CN apresentam características de diferenciação celular dependendo do microambiente a que são expostas. Esta informação pode ser fornecida através de culturas de células e as análises clonais. Desta maneira, é aceito o conceito das células da CN como uma população heterogênea de progenitores pluripotentes. São consideradas como células-tronco, cujo destino é determinado por sinais no microambiente (ABZHANOV *et al.*, 2003; LE DOUARIN *et al.*, 2004; TRENTIN *et al.*, 2004).

Nos experimentos realizados neste trabalho observamos um aumento significativo no número de células que não expressava nenhum dos fenótipos analisados da CNT (células não marcadas) sob o tratamento de FGF2. O efeito foi máximo com 10ng/mL sugerindo que este fator influencia a diferenciação das células da CNT. Vários estudos investigativos dos efeitos do polipeptídeo FGF2 em células do sistema nervoso central (SNC) têm mostrado que este fator estimula a proliferação e migração do progenitor de oligodendrócitos e inibe a sua diferenciação final. Células oligodendrócitos já diferenciadas também respondem ao FGF2, resultando em um aumento do processo de alongamento destas células (FORTIN *et al.*, 2005). Segundo Bansal *et al.*, 1997, o FGF2 pode converter oligodendrócitos do SNC em um “novo” fenótipo, pois encontrou várias células que não expressavam marcadores específicos de células oligodendrócitos após o tratamento com o fator. Em nossos resultados, sugerimos que grande parte das células da CNT possa se manter indiferenciada pela influência do FGF2. Para investigar essa possibilidade, realizamos culturas terciárias onde o FGF2 foi removido e as células

plaqueadas em meio complexo e sobre monocamada alimentadora de fibroblasto embrionário 3T3 (utilizado para a diferenciação das células da CN). Os resultados sugerem um direcionamento para o fenótipo glial e neuronal às expensas do fenótipo melanocítico. Nestas condições a proporção de miofibroblastos foi muito baixa.

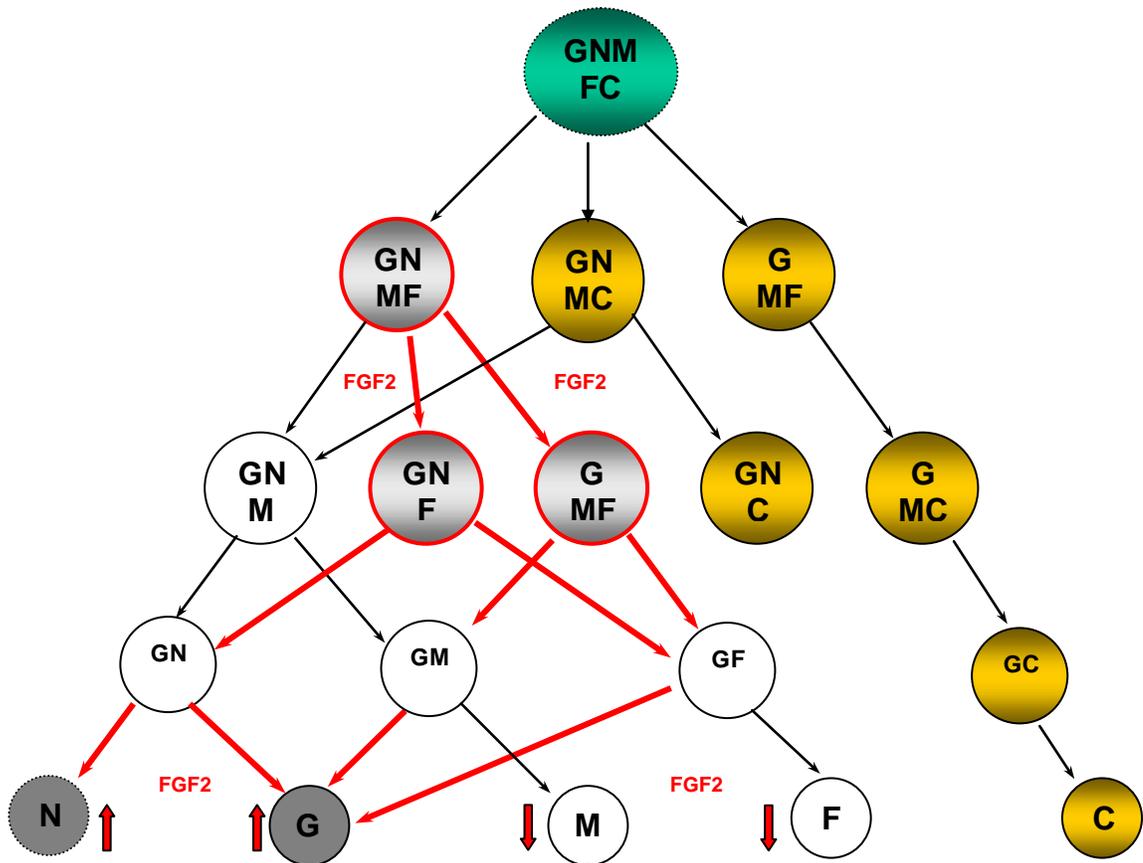
Células da CN de aves e mamíferos podem ser reconhecidas pela expressão de marcadores de vários estágios de diferenciação celular. O epítipo HNK1 e o receptor p75 são considerados marcadores de células da CN em embriões de aves e mamíferos, principalmente células que acabaram de deixar o tubo neural no momento da migração (VINCENT & THIERY, 1984; DEREK *et al.*, 1992). Trabalhos prévios têm indicado que o epítipo HNK1 é persistentemente expresso *in vitro* em células com potencial adrenérgico, implicando que este determinante antigênico possui um papel na especificação desta linhagem em aves (HENNIG & MAXWELL, 1995). Neste trabalho investigamos a proporção de células que expressam HNK1 e p75 em culturas de 6 dias em diferentes condições de FGF2. A expressão de HNK1 foi semelhante nos controles e em culturas com o tratamento de 10ng/mL de FGF2. Este resultado em conjunto com os anteriores pode sugerir que as células que expressam HNK1 no controle correspondem a uma sub-população diferente das células HNK1 positivas encontradas em 10ng/mL de FGF2. Outra possibilidade é de que as células positivas para HNK1 correspondam a células com potencial adrenérgico, pois as análises das células neuronais e células que expressaram HNK1 mostraram picos proporcionais para o controle e com o tratamento de 10ng/mL de FGF2, sugerindo que o HNK1 pode estar expresso em células neuronais da CNT (figuras 14 e 19).

A noção de que a diferenciação celular é unidirecional e irreversível tem sido mudada através de diferentes sistemas biológicos ao longo de anos de investigação. Os ensaios realizados em sistemas nervosos de vertebrados, e em especial, de codornas mostraram que células precursoras e células tronco exibem plasticidade celular sob a influência de uma série de fatores no microambiente (REAL *et al.*, 2006). Trabalhos experimentais têm demonstrado a existência de células precursoras pluripotentes no SNC de camundongos adultos que proliferam em resposta ao FGF2 e são capazes de auto-renovar após sub-culturas. Em adição a estes experimentos, análises clonais mostraram que células tratadas com o este fator são multipotentes e geram progenitores astrogliais, oligodendrogliais e neuronais (GRITTI *et al.*, 1996). No presente trabalho,

observamos que o direcionamento dos progenitores da CNT é influenciado por FGF2. Este fator de crescimento estimulou um aumento significativo do conjunto de progenitores tri e tetrapotentes que representam os mais indiferenciados e pluripotentes da CNT. A grande maioria destes apresenta potencialidade dupla para glia e miofibroblasto. Após estes experimentos, investigamos o tamanho dos clones oriundos de células individuais da CNT e encontramos valores significativos em clones grandes, com mais de 1000 células, para progenitores tri e tetrapotentes. Os valores foram similares aos resultados obtidos se considerados apenas clones com potencialidade para glia e miofibroblasto ao mesmo tempo. Estes dados sugerem que o FGF2 pode influenciar na proliferação, como também na renovação dos progenitores mais indiferenciados da CNT (GNF, GMF e GNMF) e a retirada do estímulo (fator) estimula a diferenciação destes progenitores para células gliais e neuronais.

O fator FGF2 é conhecido pelos seus efeitos em progenitores neuronais (MCKINNON *et al.*, 1990) e vários experimentos têm demonstrado que este fator é um mitógeno importante para a manutenção de proliferação de progenitores multipotentes *in vitro* (GRITTI *et al.*, 1999; TROPEPE *et al.*, 1999). Nossos resultados são coerentes com dados anteriores da literatura em relação ao efeito de FGF2 em progenitores do SNC. Trabalhos realizados por Quian *et al.*, (1997), sugerem que uma mudança no direcionamento celular devido à concentração de FGF2 tem um papel importante na regulação do destino das células tronco neurais do SNC. Em adição, o FGF2 pode ativar ambos os programas gliais e neuronais em resposta a estas células, e concentrações específicas deste fator de crescimento podem promover um aumento de um precursor comum para células gliais e neurônios (PALMER, *et al.*, 1999).

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho propomos um modelo de atuação de FGF2 na potencialidade de células da CNT de codornas *in vitro* (figura 20). Segundo nosso modelo, FGF2 estimula a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e pluripotentes da CNT mantendo-os indiferenciados. Ao mesmo tempo o fator estimula programas de diferenciação celular para as linhagens glial e neuronal em detrimento da diferenciação melanocítica e miofibroblástica, cuja diferenciação terminal só ocorre com a retirada de FGF2.



**Figura 7: Modelo de linhagens celulares na CN.** Progenitores são classificados de acordo com o número de potenciais de desenvolvimento. Células totipotente da CN de codornas passam por restrições progressivas de desenvolvimento produzindo precursores intermediários oligopotentes e finalmente monopotent progenitores que diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M), miofibroblastos (F) e cartilagem (C). Adaptado de Barroffio et al (1988); Dupin et al. (1999) e Trentin et al. (2004). A existência do progenitor totipotente GNMFC é hipotética. Aqui nós demonstramos que os precursores GMF, GNF e GNMF são estimulados pelo FGF2 (linhas vermelhas) em se manter indiferenciados. FGF2 também pode direcionar células da CNT para fenótipos gliais e neuronais.

## 5. CONCLUSÕES

O fator de crescimento FGF2 exerce diferentes efeitos em células da CNT, sendo evidente o aumento da proliferação celular, sem alterar a sobrevivência;

A proliferação de células da CNT é influenciada pelo fator e a proporção foi maior em culturas tratadas com 10ng/mL de FGF2;

Em todas as culturas de células houve diminuição do número de células marcadas para os fenótipos da CNT na presença de FGF2;

Dentre as concentrações analisadas, culturas tratadas com 10ng/mL de FGF2 apresentaram maior proporção de células não marcadas (negativas) para os fenótipos da CNT;

O fator de crescimento FGF2 pode manter as células da CNT em um estágio mais indiferenciado e este efeito é dependente da concentração;

O FGF2 pode direcionar células da CNT pela proliferação e renovação dos progenitores da CNT em culturas estimulando a diferenciação neuronal e glial *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABZHANOV, A.; TZAHOR, E.; LASSAR, A.; TABIN, C. (2003): **Dissimilar regulation of cell differentiation in mesencephalic (cranial) and sacral (trunk) neural crest cells in vitro.** *Development* 130: 4567-79.

AGUIAR, C.M.; GARCEZ, R.C.; SILVA, M.A.; TRENTIN, A.G. (2002): **Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization.** *Int. J. Dev. Neuroscience* 20: 563 -71.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2006): **Biologia Molecular da Célula** (4ª edição) São Paulo: Editora Artmed, 1090-117.

ANDERSON, D.J. (1989). **The neural crest Cell lineage problem: Neuropoiesis?** *Neuron* 3: 1-12.

BANSAL R.; PFEIFFER S. E. (1997): **FGF2 converts mature oligodendrocytes to a novel phenotype.** *J. Neurosci. Res.* 50: 215-28.

BAREMBAUM, M.; BRONNER-FRASER, M. (2005): **Early steps in neural crest specification.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 642-46.

BAROFFIO, A.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N.M. (1991): **Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest.** *Development* 112: 301-305.

BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. (1992): **The FGF family of growth factors and oncogenes.** *Adv. Cancer Res.* 59: 115-65.

CHIOU, M.; XU, Y.; LONGAKER, M.T. (2006): **Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343: 644-52.

COSTA, M. C. (2006): **Estudo dos efeitos da matriz extracelular na morfogênese da crista neural em *Coturnix coturnix japonica*.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 62pp.

COSTA, M. C.; COSTA-SILVA, B.; MELO, F. R.; NEVES, C. M.; ALVAREZ-SILVA, M.; CALLONI, G. W.; TRENTIN, A. G. (2007): **Fibronectin promotes myofibroblast differentiation in quail and mouse neural crest.** *Developmental Biology* (Submetido).

COULY, G.F.; ZILLER, C.; LEDOUARIN, N. M. (1993): **Patterning of Neural Crest Derivatives in the Avian Embryo: *in Vivo* and *in Vitro* Studies.** *Developmental Biology* 159: 24-49.

DAILEY, L.; AMBROSETTI, D.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C. (2005): **Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling.** Cytokine Growth Factor Reviews 16: 233-247.

DEREK, L. S.; ANDERSON, D. J. (1992): **Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.** Cell 71: 973-85.

DONO, R.; TEXIDO, G.; DUSSEL, R.; EHMKE, H.; ZELLER, R. (1998): **Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2 deficient mice.** EMBO J. 17: 4213-25.

DULAC, C.; TRAPAK, M. B.; CAMERON-CURRY, P. ; ROSSIER, J. ; MARSHAK, D. R. ; RODER, J. ; LE DOUARIN, N. (1992): **Molecular characterization of the Schwann cell myelin protein, SMP : Structural similarities within the immunoglobulin superfamily.** Neuron 8: 323-34.

DUPIN, E.; BAROFFIO, A.; DULAC, C.; CAMERON-CURRY, P. (1990): **Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-schwann cell myelin protein monoclonal antibody.** Neurobiology 87: 1119-23.

DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. (1995): **Retinoic acid promotes the differentiation of adrenergic cells and melanocytes in quail neural crest cultures.** Developmental Biology 168: 529-48.

DUPIN, E.; REAL, C.; LE DOUARIN, N. (2001): **The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3.** An. Acad. Bras. Cienc.73 (4): 533-45.

DUPIN, E.; REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N. (2003): **Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages : Transition from Schwann cells to glial- melanocytic precursors *in vitro*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 5229-33.

ESWARAKUMAR, V.P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. (2005): **Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.** Cytokine Growth Factor Rev. 16(2): 139-49.

FORTIN, D.; ROM, E.; SUN, H.; YAYON, A.; BANSAL, R. (2005): **Distint fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage.** J. Neuros. 25(32): 7470-79.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology** (6 ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.

GILBERT, S. F. **Developmental biology** (7th ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 2003.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H. L. (1951): **A series of normal stages in the developmental chick embryo.** Journal of Morphology 88: 49-92.

HENION, P. D.; WESTON, J. A. (1997): **Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage.** Development 124: 4351-59.

HENNIG, A. K.; MAXWELL, G. D. (1995): **Persistent correlation between expression of a sulfated carbohydrate antigen and adrenergic differentiation in cultures of quail trunk neural crest cells.** Differentiation 59: 299-306.

KALCHEIM, C.; NEUFELD, G. (1990): **Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos.** Development 109: 203-15.

KNECHT A. K.; BRONNER-FRASER, M. (2002): **Induction of the neural crest: a multigene process.** Nat. Rev. Genet 3: 453-61.

KROTOSKI, D.; DOMINGO, C.; BRONNER-FRASER, M. (1986): **Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in avian embryo.** J. Cell. Biol. 103: 1061-71.

LALLIER, T.; LEBLANC, G.; ARTINGER, K.; BRONNER-FRASER, M. (1992): **Cranial and trunk neural crest cells use different mechanisms for attachment to extracellular matrices.** Development. 116: 531-41.

LAHAV, R.; ZILLER, C.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. (1996): **Endothelin-3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 3892-97.

LAHAV, R.; DUPIN, E.; LECOIN, L.; GLAVIEUX, C.; CHAMPEVAL, D.; ZILLER, C.; LE DOUARIN, N.M. (1998): **Endothelin-3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocyte precursors *in vitro*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 14214-19.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R. (1990): **CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.** Cell 60: 585-95.

LE DOUARIN, N.M.; DUPIN, E.; ZILLER, C. (1994). **Genetic and epigenetic control in neural crest development.** Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 685-95.

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

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. (2004): **Neural crest cell plasticity and its limits.** Development 131: 4637-50.

MARTINEZ, R.; GOMES, F.C. (2005): **Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway.** J. Neurosci. Res. 80: 341-49.

MCKINNON, R. D.; MATSUI, T.; DUBOIS-DALCQ, M.; AARONSON, S. A. (1990): **FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development.** Neuron 5: 603-14.

MORRISON, S. J.; WHITE, P. M.; ZOCK, C.; ANDERSON, D.J. (1999): **Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells.** Cell 96: 737-49.

MURPHY, M.; REID, K; FORD, M; FURNESS, J.B; BARTLETT, P.F. (1994): **FGF2 regulates proliferation of neural crest cells with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors.** Development 120: 3519-28.

NICOLE, M.; LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. (2004): **Neural crest cell plasticity and its limits.** Development 131: 4637-50.

PALMER, T. D.; MARKAKIS, E. A.; WILLHOITE, A. R.; SAFAR, F.; GAGE, F. H. (1999): **Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS.** J. Neurosci. 19: 8487-97.

PERRIS, R.; PERISSINOTO, D. (2000): **Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration.** Mech. Dev. 67: 444-64.

PERRIS, R.; KROTOSKI, D.; BRONNER-FRASER, M. (1991): **Collagens in avian neural crest development: distribution *in vivo* and migration promoting ability *in vitro*.** Development. 113: 969-84.

QUIAN, X.; DAVIS, A. A.; GODERIE, S. K.; TEMPLE, S. (1997): **FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells.** Neuron 18: 81-93.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE DOUARIN, N.; DUPIN, E. (2005): **The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts.** Int. J. Dev. Biol. 49: 151-59.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.; DUPIN, E. (2006): **Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potencial.** Dev. Biol. 300: 656-69.

SARKAR, S.; PETIOT, A.; COPP, A.; FERRETTI, P.; THOROGOOD, P. (2001): **FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells.** Development 128: 2143-52.

SHAH, N. M.; MARCHIONNI, M.A.; ISAACS, I.; STROOBANT, P.; ANDERSON, D. J. (1994): **Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate.** Cell 77: 349-60.

SHAH, N. M.; GROVES, A. K.; ANDERSON, D. J. (1996): **Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness.** Cell 85: 331-43.

SHERMAN, L.; STOCKER, K.; MORRISON, R.; CIMENT, G. (1993): **Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-Schwann cell precursors into melanocytes.** Development 118: 1313-26.

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

SIEBER-BLUM, M. (1991): **Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells.** Neuron 6: 949-55.

SIEBER-BLUM, M.; ITO, K.; RICHARDSON, M. K.; LANGTIMM, C. J.; DUFF, R. S. (1993): **Distribution of pluripotent neural crest cells in the embryo and the role of brain-derived neurotrophic factor in the commitment to the primary sensory neuron lineage.** J. Neurosci. 24: 173-84.

STEVENTON, B.; CARMONA-FONTAINE, C.; MAYOR, R. (2005): **Genetic network during neural crest induction: From cell specification to cell survival.** Semin. Cell. Dev. Biol. 1084-9521.

TRENTIN, A.G.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N.; DUPIN, E. (2004): **Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10: 4495-500.

TROKOVIC, N.; TROKOVIC, R.; PARTANEN, J. (2005): **Fibroblast growth signaling and regional specification of the pharyngeal ectoderm.** Int. J. Dev. Biol. 49: 797-805.

TROPEPE, V.; SIBILIA, M.; CIRUNA, B. G.; ROSSANT, J.; WAGNER, E. F.; VAN DER KOOY, D. (1999): **Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon.** Dev. Biol. 208: 166-88.

VILLEGAS, S. N.; NJAINE, B.; LINDEN, R.; CARRI, N. G. (2006): **Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways.** Brain Res. Bull 71: 116-26.

VINCENT, M.; THIERY, J. P. (1984): **A cell surface marker for neural crest and placodal cells: Further evolution in peripheral and central nervous system.** Dev. Biol. 103: 468-81.

ZHANG, J. M.; HOFFMANN, R., SIEBER-BLUM, M. (1997): **Mitogenic and proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF- $\beta$ 1.** Developmental Dynamics. 208: 375-86.

# **ANEXOS**

## **Anexo I**

### **Extrato de embrião**

Incubaram-se ovos fertilizados de galinha por um período de 11 dias a 37°C em incubadora úmida. Limpou-se a casca dos ovos cuidadosamente com etanol a 70%. Quebraram-se os ovos, depositando os embriões em placas de petri contendo PBS a 4°C (utilizar aproximadamente 7 mL de PBS para cada 3 embriões). Removeram-se os olhos dos embriões com a ajuda de uma tesoura e de uma pinça. Maceraram-se então os embriões com a ajuda de uma seringa de 20 mL, passando-os diretamente para um tubo de centrifuga estéril de 50 mL. Adicionou-se ao tubo volume equivalente aos embriões masserados de meio de cultura  $\alpha$ -MEM, passando todo o conteúdo do tubo novamente por uma seringa de 20 mL para outro tubo estéril. Centrifugou-se o tubo de 50 mL à 2000 rcf, à 7°C, por 10 minutos. Filtrou-se o sobrenadante inicialmente em um pré-filtro de 0,8  $\mu$ m, passando posteriormente por uma membrana de 0,45 $\mu$ m. A temperatura do extrato pronto em estoque é de -20°C.

## **Anexo II**

### **Solução Salina de fostato Tamponada (PBS)**

Adicionou-se a 1 litro de água destilada ou MilliQ 8g de Cloreto de Sódio (NaCl), 0,09g de Cloreto de Potássio (KCl), 3g de Fosfato de Sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,4g de Fosfato de Potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Verificou-se o pH que deveria estar em 7,4. Se estivesse inferior ou superior ao desejado corrigiu-se com solução de Hidróxido de sódio (NaOH) a 2N ou Ácido clorídrico (HCl) a 2N, respectivamente, até atingir o pH desejado.

## **Anexo III**

### **Glicerina Tamponada**

Preparou-se 2 soluções distintas (A e B): para a solução A, adicionou-se 5,3g de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em 100mL de água destilada; para a solução B, adicionou-se 4,2g de Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) em 100mL de água destilada. Em seguida verteu-se 10mL de solução A em 13mL de solução B. Verificou-se o pH que deveria estar em 9,0. Adicionou-se após, uma parte da solução AB em nove partes de glicerol. Conservou-se a 20°C.