

Ricardo Mueller Cesario Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DO FOLÍCULO PILOSO COMO NICHOS
DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS E EPIDERMIS EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento da
Universidade Federal de
Santa Catarina, como
requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.

Orientador: PROF.DRA. ANDRÉA GONÇALVES TRENTIN

Florianópolis
2011

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representou uma superação de forças e fracassos, onde alegrias e vitórias, familiares, amigos e amores também estiveram sempre presentes, fornecendo a força necessária para esta conquista.

A minha orientadora Dra. Andrea Gonçalves Trentin, por ter me acolhido no laboratório acreditado e não desistido de mim.

Aos meus pais Victor e Regina e meu Irmão Guilherme, por nunca terem perdido as esperanças, sempre me mostrando que era possível, permitindo que este sonho fosse realizado, o meu sincero e eterno amor!

Aos demais professores do grupo LACERT, Giordano, Marcio e Ricardo, por também terem acreditado e me ajudado em vários momentos.

Ao Bruno, Claudia e Ricardo ex-alunos, mas não menos amigos, por terem participado e compartilhado seus conhecimentos comigo, nas primeiras etapas quando entrei no Laboratório.

A todos os alunos e ex-alunos ou mesmo transeuntes que algum dia passaram pelo LACERT: Jerê e Rafael, Meline, Bianca (folgada) Bianka (movimento tropicália selvagem do maracatu atômico cigano), "Dra" Suelen, Fernanda, Vó Denise, Coronel Alú, Maristela e Juliano, Marco dos Anjos, Bruna, Beatriz, Diego, Maria Cecília, Ana, Diana, Bibiane, Silvia, Sabrina, Viviane, Sarah, Ezequiel, Ricardinho, Lucas, Addeli, Camila, e muitos outros que me perdoem por ter esquecido de mencionar. Por toda a ajuda, festas, crises de tpm contraída pela maioria feminina do laboratório, e tantos bons momentos passados juntos, MUITO OBRIGADO!

A Juliana Miguxa, que foi a pessoa que mais esteve ao meu lado nesta fase, antes como amiga agora como amor, me ajudando, apoiando e me aturando nesta jornada, te amo!

A todos os meus amigos e familiares que mesmo fora do laboratório, me ajudaram seja com um churrasco, cheese bacon, cerveja ou apenas com companhia e piadas de baixo calão. Estiveram sempre presentes ao meu lado, vocês sabem quem são, e também sabem a admiração e carinho que sinto por todos vocês, obrigado a todos.

Enfim todos que de alguma forma me ajudaram e me apoiaram, meus sinceros agradecimentos!

*“Toda a descoberta da
ciência pura é
potencialmente subversiva;
por vezes a ciência deve ser
tratada como um inimigo
possível”.*

Aldous Huxley

RESUMO

Células tronco são células com capacidade de auto renovação, e de diferenciação em diversos tipos celulares. Nos últimos anos, muitos estudos têm se dedicado à identificação de células tronco em tecidos adultos como modo de desenvolver estratégias para regeneração e reparo tecidual. A crista neural é uma estrutura embrionária de vertebrados, originada na parte dorsal do tubo neural em fechamento, durante o processo de neurulação. Estas células possuem uma característica migratória, que é iniciada com o fechamento do tubo neural, e são distribuídas pelo embrião contribuindo para o desenvolvimento de vários tecidos. O folículo piloso é uma estrutura exclusiva de mamíferos, e é considerado um anexo do tecido epitelial. Esta estrutura possui uma composição complexa, que inclui glândula sebácea, a saliência do bulge, eixo do cabelo (que se projeta externamente da epiderme), e a papila dermal. Assim como outros tecidos adultos o folículo piloso dispõe de células tronco residentes, presentes no bulge, que é um discreto microambiente, também conhecido como saliência do folículo piloso. As células tronco epidermais encontradas no bulge são identificadas principalmente pela expressão das citoqueratinas 15 e 19 (KRT 15 e 19). Em contrapartida, também são encontradas no bulge, células que apresentam as citoqueratinas 5 e 14 (KRT5 e 14), que caracterizam células no estágio final de diferenciação da linhagem epidermal. Com isso, nosso trabalho focou em analisar o folículo piloso de vibrissas de camundongos como potencial nicho de células tronco com características epidermais e de crista neural, avaliando diferentes condições de cultivo. Utilizamos camundongos com idade entre 8 e 10 semanas, dos quais eram isoladas as vibrissas, o folículo piloso dissecado, e o bulge cultivado como explante. As culturas de explante do bulge eram realizadas em placas de 24 poços sobre colágeno tipo I. Após 7 ou 14 dias estas eram fixadas para realização de imunofluorescência indireta ou extração de mRNA e realização do RT-PCR. Os marcadores celulares testados foram KRT14, P75, Nestina e TRP2. . Avaliamos a ação dos meios simples, simples com EE e complexo, além de verificar os efeitos da adição do

morfógeno sonic hedgehog (SHH, 10nM e 100nm) ao meio complexo e também medimos o halo de migração/crescimento em volta do explante. Observamos que as células iniciam sua migração do explante para a placa de cultura por volta do 4^o dia de cultivo e representam uma população heterogênea com grandes variações nas mesmas condições testadas. Estas células apresentam características epidermais (TRP2 e KRT14, marcadores de melanócitos e queratinócitos, respectivamente) e também de crista neural (Nestina e P75). A expressão dos marcadores de crista neural foi mais expressiva nas culturas de 14 dias. O meio complexo também se mostrou mais eficiente que os demais, em relação a migração das células KRT14 do folículo piloso para a placa de cultura e diferenciação para queratinócitos. Em conjunto, nossos resultados demonstram que o folículo piloso corresponde a um nicho com populações de células progenitoras com características epidermais e de crista neural e com importante potencial terapêutico e biotecnológico.

Palavras chave: Folículo Piloso, Células Tronco e Células Epidermais

ABSTRACT

Stem cells are cells with self-renewal ability and differentiation into various cellular types. In recent years, many studies have been dedicated to the identification of stem cells in adult tissues as a way to develop strategies for regeneration and tissue repair. The neural crest is an embryonic structure of vertebrates, originated at the dorsal neural tube closure, during the process of neurulation. These cells have a migratory feature, which starts with the closure of the neural tube, and are distributed by embryo contributing to the development of various tissues. The hair follicle is a unique structure to mammals, and is considered an attachment of epidermal tissue. This structure has a complex composition, which includes sebaceous gland, the bulge salience, the hair shaft (that falls outside of the epidermis), and the dermal papilla. As well as other adult tissues has the follicle stem cells residents in the bulge, which is a discreet microenvironment, also known as salience of the follicle. The epidermal stem cells found in the bulge are identified mainly by the expression of cytoqueratins 15 and 19 (KRT 15 and 19). In contrast, are also found in the bulge, cells that have the cytokeratins 5 and 14 (KRT15 and 14), that characterize cells in the final stage of epidermal lineage. With this, our work focused on analyzing the follicle pits of mice as potential stem cell niche with epidermal features and neural crest, evaluating different cultivation conditions. We use mice aged between 8 and 10 weeks of which were isolated from the whiskers, the follicle dissected, and the bulge cultivated as explants. Explants cultures of the bulge were realized in 24 wells plate dishes, on type I collagen. After 7 or 14 days these cultures were fixed for achievement of indirect immunofluorescence or mRNA extraction and realization of RT-PCR. This cells markers was tested were KRT14, P75, Nestin and TRP2. . Evaluate the action simple medium, simple medium with EE and complex medium, and check the effects of addition of morfogen sonic headhog (SHH, 10nM to 100nm) in the complex medium and also measure the migration/border around the explants growth. We note that the cells start their migration from explants culture card around the day 4 of cultivation and represent a heterogeneous population with large variations in the

same conditions tested. These cells presents epidermal characteristics (TRP2 and KRT14, markers of melanocytes and keratinocytes, respectively) and also of neural crest (Nestina and P75). The expression of neural crest markers was more expressive with 14 days. The complex also proved more efficient than the other, in relation to the cells migration KRT14 follicle to the culture and differentiation to keratinocytes. Together, our results show that the follicle is a niche with populations of progenitor cells with epidermal characteristics and neural crest and important potential therapeutic biotechnology.

Keywords: Hair Follicle, Stem Cells and Epidermal Cells

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
BMP	Proteína Morfogenética Ossea
CT	Célula Tronco
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EE	Extrato de Embrião
E13	Décimo Terceiro Dia Embrionário
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FP	Folículo Piloso
Ig	Imunoglobulina
KRT	Citoqueratina
nM	Nano Molar
PBS	Tampão Fosfato Salina
RNA _m	RNA mensageiro
SBF	Soro Bovino Fetal
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SKP	<i>Skin de rivated progenitors</i>
TxRd	Vermelho do Texas
U.V.	Ultra Violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de auto renovação.....	11
Figura 2. Divisões celulares em células tronco.....	12
Figura 3. Fechamento do tubo neural.....	14
Figura 4. Folículo piloso.....	16
Figura 5. Ciclo de crescimento do folículo piloso.....	17
Figura 6. Desenvolvimento do folículo piloso.....	18
Figura 7. fatores e genes envolvidos na morfogênese.....	19
Figura 8. Marcadores do folículo piloso.....	21
Figura 9. Cultura de explante de folículo piloso.....	31
Figura 10. Curva de migração/crescimento.....	33
Figura 11. Gráfico de migração/crescimento com 7 e 14 dias.....	34
Figura 12. KRT14 no folículo piloso sem cultura.....	36
Figura 13. KRT14 no folículo piloso com 7 dias em meio simples.....	37
Figura 14. KRT14 no folículo piloso com 7 dias em meio simples mais EE.....	38
Figura 15. KRT14 na papila do folículo piloso com 7 dias em meio simples mais EE.....	38
Figura 16. KRT14 no folículo piloso com 7 dias em meio complexo.....	39
Figura 17. Nestina no folículo piloso com 7 dias em meio simples.....	40
Figura 18. Nestina no folículo piloso com 7 dias em meio simples mais EE.....	40
Figura 19. Nestina no folículo piloso com 7 dias em meio complexo.....	41
Figura 20. KRT14 no folículo piloso com 14 dias em meio simples.....	42
Figura 21. KRT14 no folículo piloso com 14 dias em meio simples mais EE.....	43
Figura 22. KRT14 no folículo piloso com 14 dias em meio complexo.....	44
Figura 23. Nestina no folículo piloso com 14 dias em meio simples.....	45
Figura 24. Nestina no folículo piloso com 14 dias em meio simples mais EE.....	46
Figura 25. Nestina no folículo piloso com 14 dias em meio complexo.....	47

Figura 26. p75 no folículo piloso com 14 dias em meio simples.....	48
Figura 27. p75 no folículo piloso com 14 dias em meio simples mais EE.....	49
Figura 28. p75 no folículo piloso com 14 dias em meio complexo.....	50
Figura 29. Gráfico de migração/crescimento com 14 dias com SHH.....	51
Figura 30. KRT14 no folículo piloso com 14 dias em meio com 10nM de SHH.....	52
Figura 31. KRT14 no folículo piloso com 14 dias em meio com 100nM de SHH.....	53
Figura 32. KRT14 nas células com 14 dias em meio com 100nM de SHH.....	54
Figura 33. Nestina no folículo piloso com 14 dias em meio com 10nM de SHH.....	55
Figura 34. Nestina no folículo piloso com 14 dias em meio com 100nM de SHH.....	56

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	20
1.1- CÉLULAS TRONCO	21
1.2- CRISTA NEURAL	23
1.3- FOLÍCULO PILOSO	25
1.4 CICLO DE CRESCIMENTO DO FOLÍCULO PILOSO.....	26
1.5. DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO PILOSO	27
1.6. CÉLULAS TRONCO EPIDERMAS DE FOLÍCULO PILOSO	29
2.JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVO.....	35
3.1. OBJETIVO GERAL.....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
a) Estabelecer e aperfeiçoar condições de cultivo de células tronco de folículo piloso utilizando diferentes meios de cultivo;	35
b) Avaliar comparativamente nos diferentes meios de cultura, o halo de crescimento das células provenientes do folículo piloso na placa de cultura.....	35
c) Caracterizar fenotipicamente as culturas de células de folículo piloso, avaliando a expressão de marcadores em diferentes estágios de diferenciação celular.	35
d) Avaliar o efeito do <i>Sonic hedgehog</i> (Shh) na expressão de células positivas para citoqueratina 14 (KRT14) e nestina.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1.CULTURA PRIMÁRIA DE FOLÍCULO PILOSO	37

4.3. MEDIDA DO HALO DE CRESCIMENTO.....	38
4.4. RT-PCR	39
4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA	40
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO	43
5.2. ANÁLISE DO HALO DE MIGRAÇÃO/ CRESCIMENTO .	44
5.3. ANÁLISE DE MARCADORES FENOTÍPICOS POR RT-PCR.....	48
5.4. ANÁLISE DOS MARCADORES FENOTÍPICOS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	49
a) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14 no folículo piloso integro	49
b) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14 e nestina em culturas primárias de folículo piloso após 7 dias de cultivo.....	50
c) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14, p75 e nestina em culturas primárias de folículo piloso após 14 dias de cultivo.....	56
5.4. ANÁLISE DOS EFEITOS DE SONIC HEADHOG (SHH) SOBRE AS CÉLULAS POSITIVAS PARA NESTINA E KRT14	65
6. DISCUSSÃO	73
6.1. HALO DE MIGRAÇÃO/CRESCIMENTO	73
6.2. MARCADORES DE CRISTA NEURAL	74

6.3. MARCADORES DE PRECURSORES EPIDERMIS	75
6.4. EFEITO DE SHH.....	77
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERÊNCIAS	80

1- INTRODUÇÃO

1.1- CÉLULAS TRONCO

Células tronco são células com uma capacidade indefinida de auto renovação, e potencialidade para diferenciação em diversos tipos celulares (Figura 1)(Alison & Islam 2009) Estas células são encontradas tanto em tecidos adultos como embrionários e quanto maior o grau de diferenciação, menor sua potencialidade. Desse modo, são classificadas de acordo com sua potencialidade em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células tronco totipotentes possuem capacidade de diferenciação em todos os tecidos embrionários e extra embrionários, sendo encontradas na fase embrionária do zigoto até a mórula. As células tronco pluripotentes são encontradas na massa celular interna do blastocisto e apresentam potencialidade para diferenciação em tecidos provenientes dos 3 folhetos embrionários. Já as células tronco multipotentes apresentam potencialidade restrita a uma camada germinativa ou tecido e podem ser encontradas nos tecidos adultos (Alison & Islam 2009).

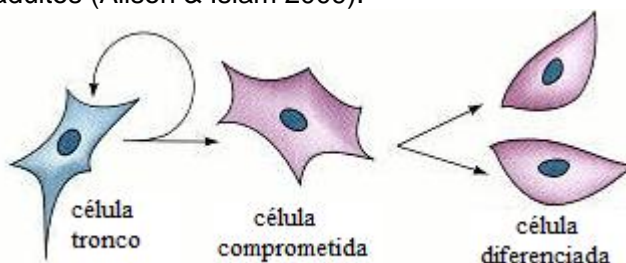


Figura 1. Ilustração de auto renovação de células tronco e diferenciação em mais de um fenótipo celular, modificado de Gilbert 6^a ed., 2000.

Nos últimos anos, muitos estudos tem se dedicado à identificação de células tronco em tecidos adultos como modo de desenvolver estratégias para regeneração e reparo tecidual (Sieber-Blum, Grim et al. 2004). Desta forma, células tronco tem

side encontradas em muitos tecidos adultos, incluindo os sistemas hematopoiético e nervoso, pele, intestino e músculos. Para manter a homeostase tecidual, as células tronco multipotentes residentes nos tecidos adultos, possuem dois importantes papéis. Um deles relacionado à manutenção do número constante de células e o outro relacionado a reparos de lesões que podem ocorrer nestes tecidos. Assim, a homeostase é mantida pelas divisões celulares simétricas e assimétricas. Como observado na figura 2, as divisões celulares simétricas originam, duas células idênticas entre si, que podem ou não, ser também idênticas à célula mãe. Na divisão assimétrica as células geradas são diferentes entre si, podendo uma delas ser semelhante à célula que as originou (Blanpain & Fuchs 2009). A manutenção das células tronco encontradas nos tecidos ocorre pela autorrenovação destas células, permitindo que seu número mantenha-se constante, principalmente após ativação em resposta a uma lesão ocorrida no tecido (Alison & Islam 2009). Porém, este fenômeno de autorrenovação deve ser controlado. Estudos demonstram que a perda do mecanismo de regulação destas células pode acarretar no aparecimento de tumores (Lorz, García-Escudero et al. 2010).

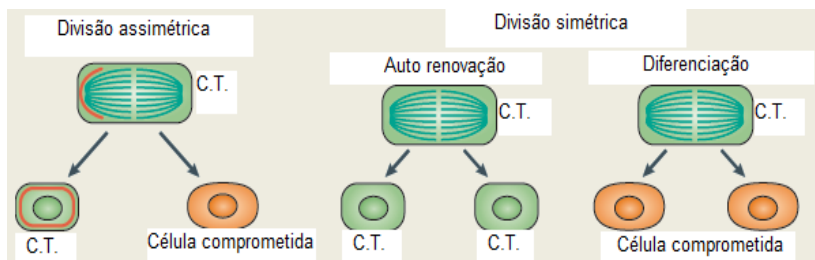


Figura 2. Representação dos 2 diferentes tipos de divisões celulares encontradas em células tronco (C.T.) (modificado de BANPLAIN & FUCHS, 2009).

1.2- CRISTA NEURAL

A crista neural é uma estrutura embrionária de vertebrados, originada na parte dorsal do tubo neural em fechamento, durante o processo de neurulação. Estas células possuem uma característica migratória, que é iniciada com o fechamento do tubo neural, e são distribuídas pelo embrião contribuindo para o desenvolvimento de vários tecidos, como os tecidos conjuntivo, ósseo e cartilaginoso da região cefálica, neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, melanócitos, dentre outros (Figura 3) (Le Douarin & Dupin 2003; Le Douarin, Calloni et al. 2008).

Ensaio *in vitro* de clonagem celular, identificaram progenitores multi e oligopontentes na crista neural e demonstraram que existe uma “hierarquia”, onde estas células diferenciam-se em “níveis” de precursores até chegarem ao fenótipo celular final, sendo que alguns destes precursores ainda possuem capacidade de autorrenovação apresentando assim a característica de células tronco (Trentin, Glavieux-Pardanaud et al. 2004); (Calloni, Glavieux-Pardanaud et al. 2007; Calloni, Le Douarin et al. 2009). Estudos recentes demonstraram ainda que células da crista neural, na região truncal de vertebrados, possuem marcadores específicos de células tronco mesenquimais, sugerindo que na embriogênese precoce estas células atuam como fornecedoras de células tronco mesenquimais para desenvolvimento de estruturas provenientes desta região (Dupin, Calloni et al. 2010).

Recentemente foram identificadas células com características de crista neural quiescentes no folículo piloso de mamíferos e no epitélio da face (Sieber-Blum, Grim et al. 2004). Ensaio de clonagem celular demonstraram que estas células além de possuírem a capacidade de autorrenovação, também podem se diferenciar em células de linhagens epiteliais (Oshima, Rochat et al. 2001) e neurais e na maioria dos fenótipos derivados da crista neural (Hu, Zhang et al. 2006), incluindo neurônios bipolares, células de Schwann e oligodendrócitos (El Seady, Huisman et al. 2008).

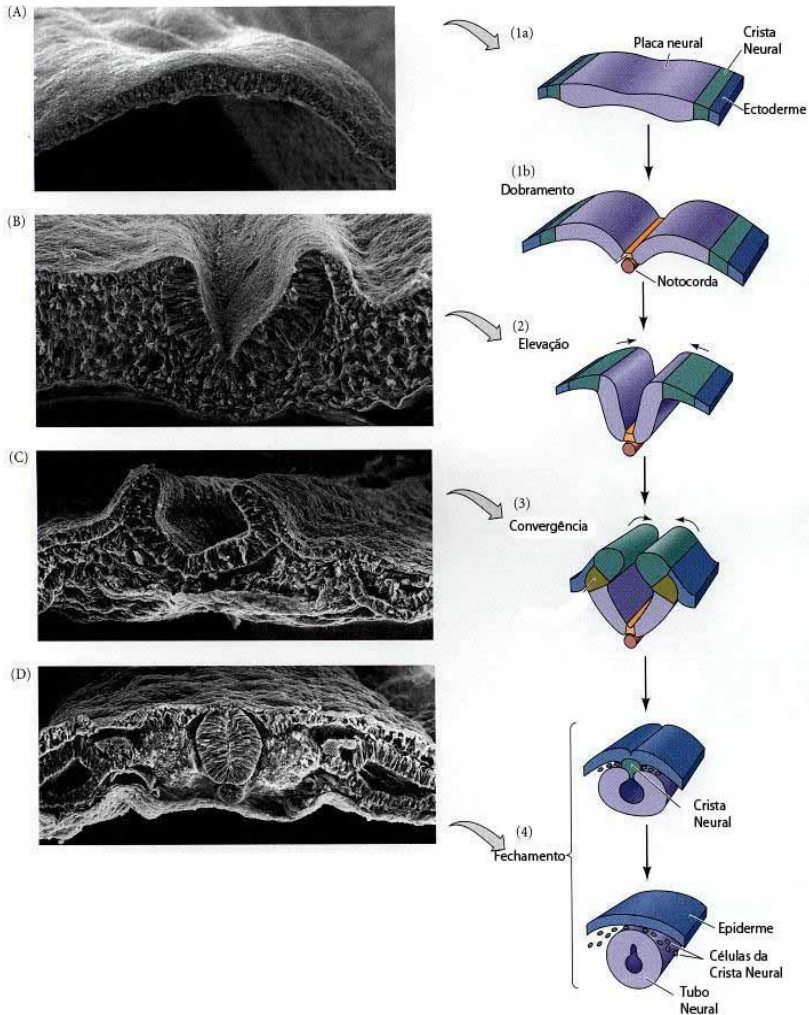


Figura 3. Demonstração por eletromicrografia e desenho, do fechamento do tubo neural e migração das células da crista neural (modificado de GILBERTS 2002).

1.3- FOLÍCULO PILOSO

O folículo piloso é uma estrutura exclusiva de mamíferos, e é considerado um anexo dérmico. Em camundongos, sua formação inicia com o surgimento do placóide no 13^o dia de gestação (E13) (Tam & Rossant; 2002). Esta estrutura possui uma composição complexa, onde se destacam outras estruturas como glândula sebácea, a saliência do bulge, haste do cabelo (que se projeta externamente da epiderme), e a papila dermal (Figura 4). Com exceção desta última, que possui origem mesodérmica, as demais são provenientes da ectoderme da mesma forma que o tecido epidermal (Blanpain, Horsley et al. 2007).

Assim como outros tecidos adultos já mencionados, o folículo piloso também dispõe de células tronco residentes no bulge, que é um discreto microambiente também conhecido como saliência do folículo piloso. O bulge é localizado na região medial do folículo, estabelecida durante a morfogênese e que não degenera durante o ciclo do cabelo. A estrutura do bulge foi primeiramente descrita em 1903 pelo anatomista alemão Philipp Stöhr da Universidade de Wurzburg, na Alemanha (Christiano 2004). Esta estrutura possui células tronco com capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares e também de autorrenovação, correspondendo, portanto a células tronco (Blanpain, Horsley et al. 2007)..

As células tronco do bulge são mais quiescentes que as outras células do folículo. No entanto, durante o ciclo do cabelo, estas células são estimuladas a sair do seu nicho, proliferar e diferenciar formando os vários tipos celulares maduros do folículo piloso. Além de fornecer células durante a regeneração do folículo, as células do bulge correspondem a um reservatório de células tronco multipotentes que podem ser recrutadas durante o reparo e regeneração da epiderme (Morris, Liu *et al.* 2004; Tumber, Guasch *et al.* 2004). Porém, a sinalização para que estas células mantenham-se indiferenciadas ou iniciem sua diferenciação é proveniente de outras regiões do folículo piloso. Esta sinalização faz com que as células assumam diferentes

rotas de migração depois de diferenciadas, formando um fluxo celular bidirecional (Blanpain, Horsley et al. 2007) Este fluxo pode ser utilizado para manutenção e crescimento do folículo, ou ainda diferenciar células em resposta a uma lesão no epitélio (Blanpain & Fuchs 2006).

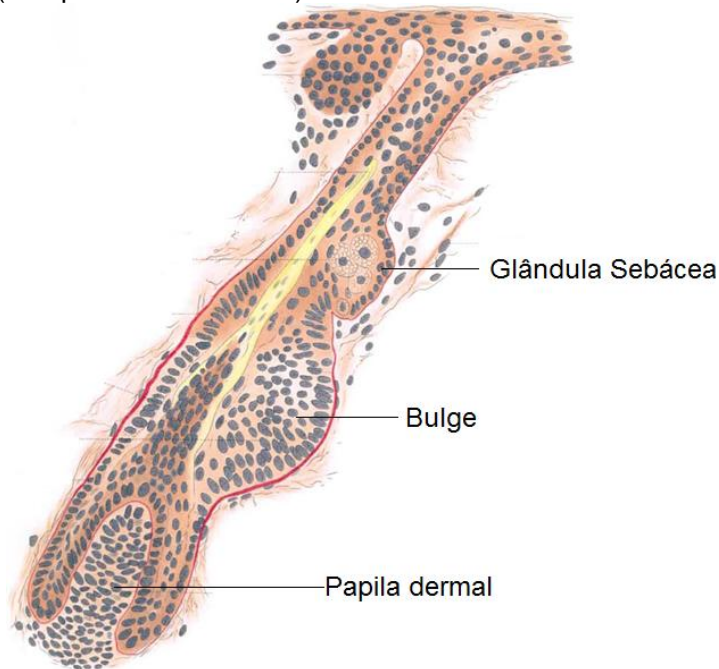


Figura 4. Ilustração de folículo piloso mostrando suas principais estruturas, com destaque para a localização do bulge (modificado de Critiano, 2004).

1.4- CICLO DE CRESCIMENTO DO FOLÍCULO PILOSO

O ciclo de crescimento do folículo piloso pode ser dividido em três fases: a telogenia ou fase de repouso, a anagenia ou fase de crescimento ou de expansão do folículo e a catagenia, onde ocorre a degeneração da porção inferior do folículo (Figura 5). O bulge se mantém íntegro nesta última fase e as células

tronco que ali residem são ativadas e iniciam a nova fase de crescimento (Blanpain, Horsley et al. 2007). Isto ocorre quando estas células tronco do bulge recebem estímulos provenientes da papila dermal (Ohyama, Terunuma et al. 2006). Essas células perdem o contato com seu nicho no bulge e migram repovoando a papila e contribuindo para o crescimento do cabelo (Blanpain & Fuchs 2006). Este ciclo possui duração média de quatro semanas tendo início com a fase de anagênese e finalizando com a fase de catagênese (Legué & Nicolas 2005).

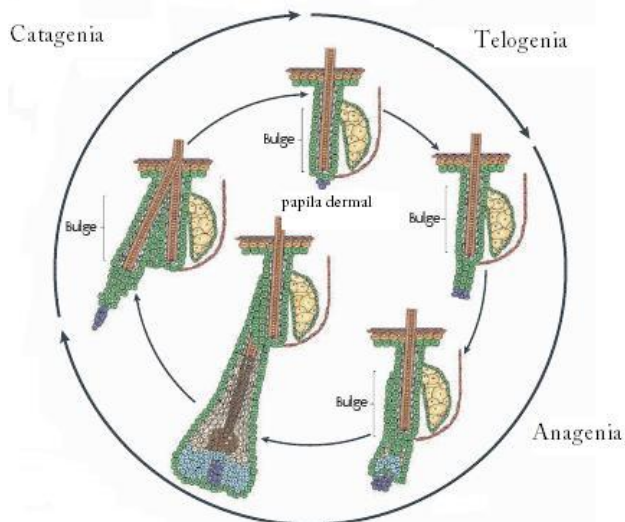


Figura 5. Crescimento do folículo piloso, demonstrando as 3 fases do ciclo (modificado de BAINPLAIN & FUCHS, 2009).

1.5- DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO PILOSO

Durante seu processo de formação, o folículo piloso desenvolve estruturas provenientes da epiderme (onde se localiza a saliência do bulge) e derme (onde se localiza a papila dermal). A interação destas estruturas possui um importante papel tanto na morfogênese, quanto no crescimento do folículo piloso (Yang & Cotsarelis 2010)

A formação do folículo piloso é precedida por um condensamento da derme, resultado de uma onda de sinalização indutiva (Figura 6). Esta onda propaga-se ao longo da epiderme, que em resposta, forma o placóide e posteriormente o broto do folículo. Estes brotos arranjam-se em uma conformação específica, onde ocorre uma sinalização mútua e polarizada, que segue a linha do eixo antero-posterior do desenvolvimento, funcionando desta forma como uma região sinalizadora para a formação do folículo (Houghton, Lindon et al. 2005).

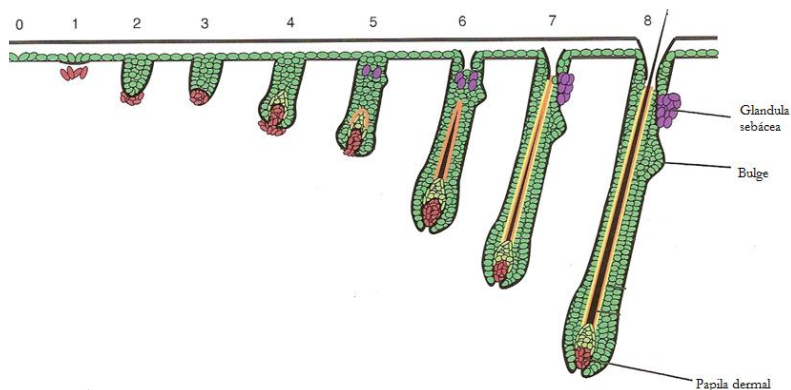


Figura 6. Fases de desenvolvimento do folículo piloso: 1 representa o início com a formação do placóide que posteriormente dará origem a papila dérmica. Na sequência são as fases de desenvolvimento já do broto até a constituição completa do folículo em 8 (modificado de Tam & Rossant; 2002).

O ponto de partida para o início desta onda sinalizadora do placóide é a estabilização da β -catenina, a qual é mediadora da via de sinalização Wnt. Com isto, a β -catenina adentra o núcleo, ativando o fator de transcrição LEF-1/TCF, que por sua vez estimula a expressão de fatores morfogênicos responsáveis pelo desenvolvimento do folículo (Figura 7). Estes fatores podem ter caráter inibitório em relação à formação do folículo, como fator de crescimento epidermal (EGF) (Blanpain, Horsley et al. 2007) e a proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), ou caráter de ativação, como os fatores de crescimento de

fibroblasto (FGFs) (Noramly, Freeman et al. 1999), *Sonic hedgehog* (SHH) (Chiang, Swan et al. 1999), Notch-1 e seu receptor Delta-1 (Crowe, Henrique et al. 1998). De uma forma geral, estes fatores apresentam sinalização antagônica em relação à diferenciação das células do folículo piloso para a linhagem epidermal. Como exemplo, os BMPs e EGF ativam a diferenciação destas células para linhagens epidermais, enquanto SHH e FGF bloqueiam esta diferenciação (Blanpain, Horsley et al. 2007).

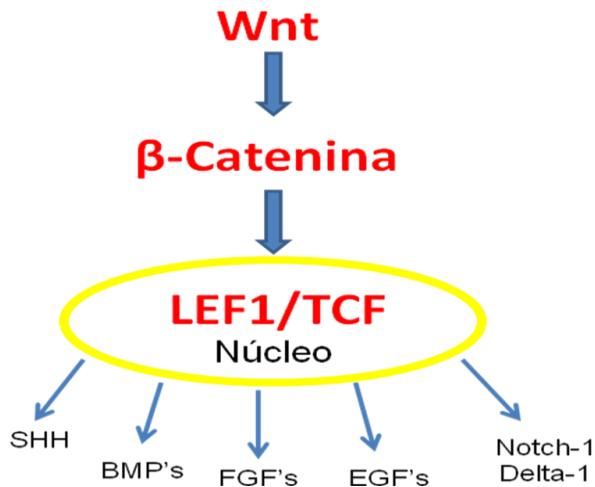


Figura 7. Ilustração de fatores e genes envolvidos na morfogênese do folículo piloso. A indução primária ocorre no citoplasma enquanto a indução secundária ocorre dentro do núcleo celular.

1.6- CÉLULAS TRONCO EPIDERMAS DE FOLÍCULO PILOSO

Estudos de análise de expressão de RNA mensageiro, em partes específicas do folículo piloso seccionado por microdissecção a laser, revelaram regiões distintas em relação a expressão de diferentes marcadores moleculares no folículo

piloso. É o caso da expressão de marcadores de células tronco de melanócitos e epidermais, que apresentam expressão heterogênea ao longo do folículo (Yamada, Akamatsu et al. 2010).

As células tronco epidermais encontradas no bulge são identificadas principalmente pela expressão de CD34 e das citoqueratinas 15 e 19 (KRT 15 e 19) (Figura 8), marcadores de superfície celular e citoplasmáticos, respectivamente. Estes marcadores caracterizam as células mais indiferenciadas (Jaks, Barker et al. 2008). Em contrapartida, também são encontradas no bulge, células que apresentam as citoqueratinas 5 e 14 (KRT 5 e 14), as quais formam os filamentos intermediários das células estratificadas do tecido epitelial e caracterizando células no estágio final de diferenciação da linhagem epidermal (Blanpain & Fuchs 2009). As células do bulge positivas para CD34, podem ainda ser divididas em 3 grupos: com alta e baixa expressão de integrina $\alpha 6$ e com expressão do marcador Lgr5, esta última com potencialidade para diferenciação de todas as linhagens epidermais (Jaks, Barker et al. 2008); (Watt & Jensen 2009). Outro importante marcador encontrado em células do bulge é o CD200, o qual é caracterizado como marcador de célula indiferenciada com uma alta capacidade proliferativa (Watt & Jensen 2009) e (Ohyama 2007).

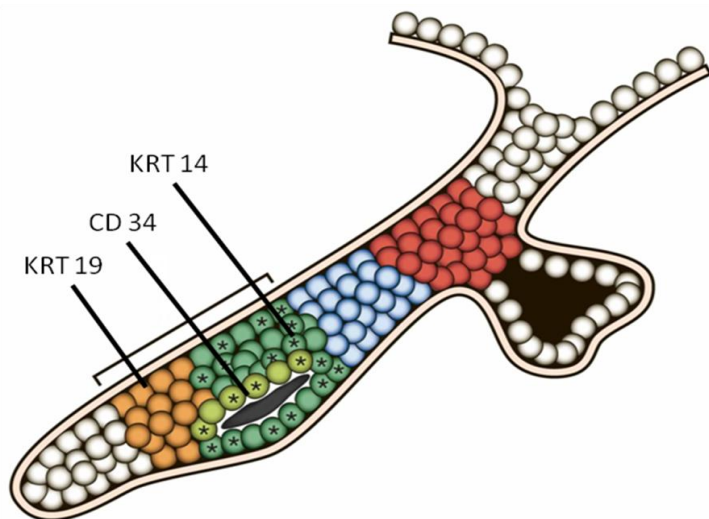


Figura 8. Região delimitada pela barra representa nicho onde são encontrados células com marcação positiva para CD34, e KRT's 15 e 19 representadas por diferentes cores, em laranja, verde escuro e claro(modificado de WATT & JENSEN, 2009).

Além das populações celulares mencionadas acima, foi descrito no folículo piloso, mais precisamente na região da papila, uma sub-população de células derivadas de crista neural denominadas progenitores derivados de pele (*Skin derived progenitors* ou SKPs) que expressam o fatores de transcrição característicos de crista neural, como Sox 2, Snail, Slug, Twist e apresentam potencialidade para diferenciação em células dermais e neurais (Blanpain & Fuchs 2009). Toda esta gama de marcadores para células progenitoras ou mesmo de células tronco, confirmam de fato que o folículo piloso possui uma população celular bem heterogênea, capaz de gerar células epidermais *in vitro*, ou mesmo *in vivo* (Sieber-Blum, Grim et al. 2004).

2- JUSTIFICATIVA

Atualmente o uso de células tronco em terapia celular representa uma forma promissora de tratamento para várias doenças. Porém, ainda existem muitas barreiras éticas e técnicas em relação ao uso destas células, principalmente em relação às de origem embrionária. A utilização de embriões para estes fins permanece proibida em diversos países, e transplantes heterólogos constituem uma limitação referente à compatibilidade entre doador e receptor. Desse modo, muitos grupos de pesquisa procuram alternativas para a utilização destas células tronco em terapias, como as células tronco multipotentes adultas, encontradas em diversos tecidos.

Como já descrito, as células do folículo piloso possuem potencial de diferenciação para as linhagens ectodérmicas, principalmente epitelial, representando uma fonte acessível e autóloga de células tronco adultas. As características das células provenientes da saliência do bulge nos levam a crer que estas podem representar uma forma viável de terapia celular, eliminando algumas das barreiras encontradas nas células tronco embrionárias, tanto éticas, por serem extraídas de tecidos adultos, como técnicas, pois o próprio receptor pode atuar antes como doador.

A presença de marcadores tanto de progenitores mais indiferenciados como mais diferenciados para os fenótipos epidérmicos, nos fez focar nossos estudos para uma possível utilização destas células em terapias para regeneração da pele. A identificação e uso de marcadores de células tronco do bulge corresponde e a uma importante ferramenta para elucidação dos mecanismos de diferenciação, controle ou ainda, manipulação destas células, representando, uma promissora forma de terapia para vários tipos de lesões do tecido epitelial, como exemplo, seu possível uso associado a matrizes de regeneração dérmicas (MRD's), para o tratamento de grandes queimados.

Porém, para que isto se torne uma realidade, os mecanismos de diferenciação ou mesmo a forma em que o destino celular fenotípico destas células seja atingido, devem ser melhor compreendidos, pois se tratando de uma população

heterogênea, o refinamento das técnicas utilizadas para manipulação destas células é fundamental de modo que apresente um menor risco para o paciente.

3- OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar e caracterizar a diferenciação das células tronco de folículo piloso em cultura de explante de vibrissas de camundongos C57Bl/6, para o fenótipo epidermal, avaliando diferentes condições de cultivo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer e aperfeiçoar condições de cultivo de células tronco de folículo piloso utilizando diferentes meios de cultivo;
- b) Avaliar comparativamente nos diferentes meios de cultura, o halo de crescimento das células provenientes do folículo piloso na placa de cultura.
- c) Caracterizar fenotipicamente as culturas de células de folículo piloso, avaliando a expressão de marcadores em diferentes estágios de diferenciação celular.
- d) Avaliar o efeito do *Sonic hedgehog* (Shh) na expressão de células positivas para citoqueratina 14 (KRT14) e nestina

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- CULTURA PRIMÁRIA DE FOLÍCULO PILOSO

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do comitê de ética animal aprovados em projeto sob o protocolo 323-CEUA/UFSC-Ofício nº 053/CEUA/PRPe/2009.

Foram utilizados camundongos jovens com idade de 8 a 10 semanas. Os animais foram sacrificados por decapitação com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Dentro de uma capela de fluxo laminar o epitélio da região facial onde se encontram as vibrissas foi removido e acondicionado em uma placa de Petri contendo PBS a 4°C. Dentro do fluxo laminar e com auxílio de um microscópio estereoscópico, a região do bulbo foi removida e o restante do tecido colocado em outra placa de Petri contendo PBS também a 4°C. Nesta nova placa, o bulge foi isolado e acondicionado em placas de cultivo de 24 poços previamente tratadas com colágeno tipo I e contendo uma mínima quantidade de meio de cultura (aproximadamente 100µl). O explante foi então incubado na estufa de CO₂ a 37°C em câmara úmida por duas horas. Após esse período, foram acrescentados 300µl de meio de cultura em cada poço da placa. Foram testados três diferentes meios de cultura como descrito a seguir:

1- *α Modified Eagle's Medium* (α-MEM) acrescido de 15% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen), denominado de *Meio Básico*;

2- α-MEM acrescido de 15% de SBF e 2% de extrato de embrião de galinha (EE), denominado de *Meio Básico acrescido de SFB*;

3- α MEM acrescido de 15% de SBF, 2% de EE e suplementado com insulina (5µg/ml), transferrina (5µg/ml), triiodotironina (2 x 10⁻⁹M), hidrocortisona (0,4 µg/ml), EGF (10 ng/ml) e FGF 2(0,2 ng/ml), antibióticos (penicilina a 50 µg/ml e estreptomina a 50 U/ml) sendo denominado de *Meio Complexo*.

4- Meio complexo contendo SHH nas concentrações de 10nM e 100nM, em diferentes ensaios.

As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias, retirando-se metade do volume e acrescentando de volta a

mesma quantidade de meio fresco (SIEBER-BLUM, M., GRIM, Y. F. HU, SZEDER, V.; 2004).

4.2- 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. Macerou-se então os embriões com a ajuda de uma seringa de 20 mL, passando-os diretamente para um tubo de centrífuga estéril de 50 mL. Adicionou-se ao tubo volume equivalente aos embriões macerados de meio de cultura α -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 μ m, passando posteriormente por uma membrana de 0,45 μ m. A temperatura do extrato pronto em estoque é de -20°C.

4.3- MEDIDA DO HALO DE CRESCIMENTO

A morfologia e a medida do halo de migração/crescimento das células a partir do explante para a placa de cultura foram analisadas diariamente até o dia 14 de cultura primária ou nos dias 7 e 14 de cultura primária, de acordo com o experimento. A medida da área de migração/crescimento das células foi obtida pelo valor da área total ocupada pelas células descontado do valor da área do explante. Os valores foram obtidos pelo uso do software ImageJ (NIH) (Costa-Silva, da Costa et al. 2009).

4.4- RT-PCR

Foi analisada a expressão do RNAm dos seguintes fatores de transcrição e proteínas marcadoras: citoqueratina 19 (células progenitoras epidermais), citoqueratina 14 (marcador de queratinócitos), Nanog TrP-2 (marcador de melanócitos) e nestina (marcador de células da crista neural e progenitores neurais) como demonstrado na Tabela 1. A extração de RNA total foi feita pelo método do Trizol. A síntese cDNA foi feita com o uso de Oligo (dT)₂₃ e transcriptase reversa a partir de 1µg do RNA total. O DNA complementar específico foi amplificado com Taq DNA polimerase usando pares específicos de oligonucleotídeos (“sense” e “antisense”) como iniciadores. As amostras foram desnaturadas a 94°C/5 min., seguida por ciclo de 94°C/30 segundos (desnaturação), 55 a 65°C/1 min. Dependendo do iniciador (anelamento), 72°C por 3 min. (extensão) por 35 ciclos. Os produtos foram separados em gel 2 % agarose, corado com brometo de etídio por 15 minutos. Sua visualização foi realizada através de uma banda no gel de agarose sensível a luz U.V., presente quando houve amplificação do transcrito do mRNA da amostra. Os resultados foram normalizados utilizando-se como padrão interno a expressão de GAPDH.

Tabela 1. Iniciadores utilizados (Integrated DNA Technologies).

Tipo Celular	Marcador	Temperatura anelamento	Tamanho	Sequência
Melanócitos	TRP 2	62°C	326 pb	Sense GAGATCTAGATCCGGTTCATGTTTCATCCT Antisense GTTCGAATTCGAGCGAGCAAACCTCCACTC
Célula epidermal diferenciada	KRT 14	55°C	227 pb	Sense AGATCCGCACCAAGGTCATGG Antisense GTGCAACTCAGAAAAAGAAGC
Célula troco indiferenciada	KRT 19	55°C	110 pb	Sense TGGCCGAGCAGAACCGBAAG Antisense AGAGCCGGGGTAAGGGTCC
Precursor de crista neural	Nestina	53°C	235 pb	Sense AATCTTTTCAGATGTGGGAG Antisense GCCACGCTCTCCAGCTCTT

Padrão interno	GAPDH	64°C	255pb	Sense TCCAGGAGCGTGACCCCAGC Antisense TGCCAGGCAGTTGGTGGTGC
----------------	-------	------	-------	--

4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta, para análise dos marcadores protéicos de diferenciação celular nas culturas de células ou nos folículos pilosos recém dissecados. Estes foram fixados com paraformaldeído a 4% por 40 minutos. A seguir as culturas foram permeabilizadas com solução de PBS e Triton-X100 a 0,25% por mais 30 minutos (com exceção do marcador de superfície celular p75) e então os sítios inespecíficos foram bloqueados com SBF 10% em PBS por 1 hora, e incubadas com anticorpos primários (Tabela 2) durante mais 1 hora a temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS Tween a 0,50% por três vezes de 5 minutos cada, sob leve agitação. A seguir foi realizada a incubação com os anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos Texas Red, FITC ou Alexa 488 (Tabela 3) durante 1h a 37°C. Os núcleos totais foram corados com DAPI (1µg/ml em água destilada) durante 1 minuto. As marcações foram visualizadas em microscópio invertido epi-fluorescente (Olympus IX71) e as imagens capturadas com o sistema de captura (DP71 Olympus).

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados

Tipo celular	Marcador	Isotipo	Diluição	Fabricante
Célula epidermal diferenciada	Citoqueratina 14	IgG ₃ de camundongo	1:100	ABcam
Precursor de crista neural/célula progenitora neural	Nestina	IgG de coelho	1:150	ABcam
Precursor de crista neural	P75	IgG de coelho	1:100	Millipore

Tabela 3. Anticorpos secundários utilizados

Anticorpo secundário	Fluorocromo	Diluição	Fabricante
IgG de Cabra anti IgG ₃ de camundongo	Alexa 488	1:100	Invitrogen
IgG de Cabra anti IgG de coelho)	FITC	1:150	Southern Biotech
IgG de Cabra anti IgG de coelho)	Texas Red	1:100	Southern Biotech

4.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newmann-Keuls ou pelo teste t de Student, quando necessário (Graphpad Prism). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS EXPLANTES DE FOLÍCULO PILOSO

Inicialmente estabelecemos as condições de cultivo dos explantes de folículo piloso de camundongo, avaliando diferentes substratos e meios de cultivo. Após a dissecação, os folículos pilosos foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços previamente tratadas com colágeno tipo I conforme descrito em materiais e métodos.

Observamos que as células que migram a partir do explante apresentam morfologia fibroblastoide, semelhante ao descrito por Sieber-Blum e colaboradores (2004) (Figura 9).

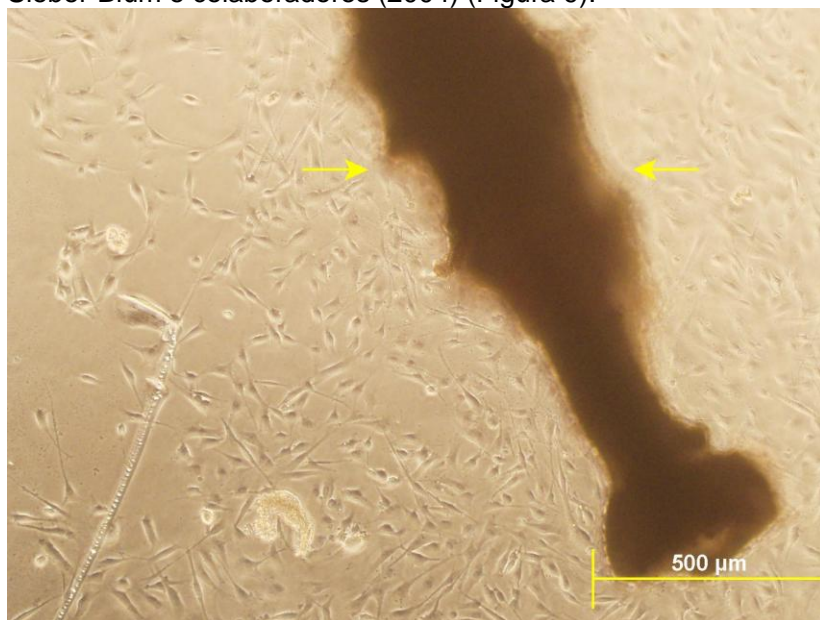


Figura 9. Fotografia de contraste de fase de uma cultura representativa de explante de folículo piloso no dia 14 de cultivo. Setas: indicam o explante do folículo piloso e ao seu redor as células que migraram a partir deste em aumento de 200 x vezes.

5.2- ANÁLISE DO HALO DE MIGRAÇÃO/ CRESCIMENTO

A seguir, avaliamos o halo de migração das células a partir de fotografias dos explantes, medindo a área que estas células ocupavam na placa de cultura, pelo programa Image J. Essa análise foi realizada entre o 1º e o 14º dia de cultivo nos meios simples, simples acrescido de EE e complexo (Figura 10). Observamos que nos três meios de cultivo analisados há um aumento progressivo do halo de migração/crescimento das células, havendo um aumento expressivo a partir do 7º - 11º dia, com um pico por volta do 14º dia. Há variações conforme os explantes.

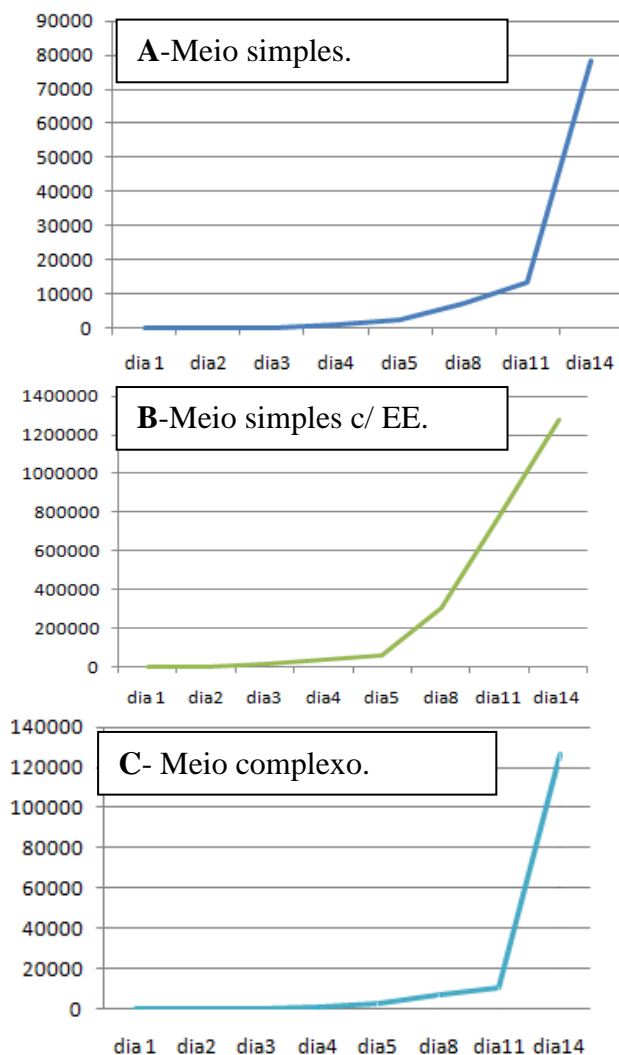


Figura 10. Curva de migração/crescimento analisada pela medida diária do halo de migração/crescimento das células Mantidas em (A) meio simples, (B) meio simples acrescido de EE ou (C) meio complexo. Foi utilizado apenas 1 explante representativo em cada condição de cultivo.

A seguir, para obter informações mais precisas, medimos o halo de migração no dia 7 e no dia 14 de cultivo em amostragem maior (Figura 11). Este experimento foi repetido 3 vezes onde utilizamos uma amostra independente de cada um dos experimentos. As culturas com 14 dias apresentaram um halo de migração/crescimento significativamente maior em relação ao dia 7.

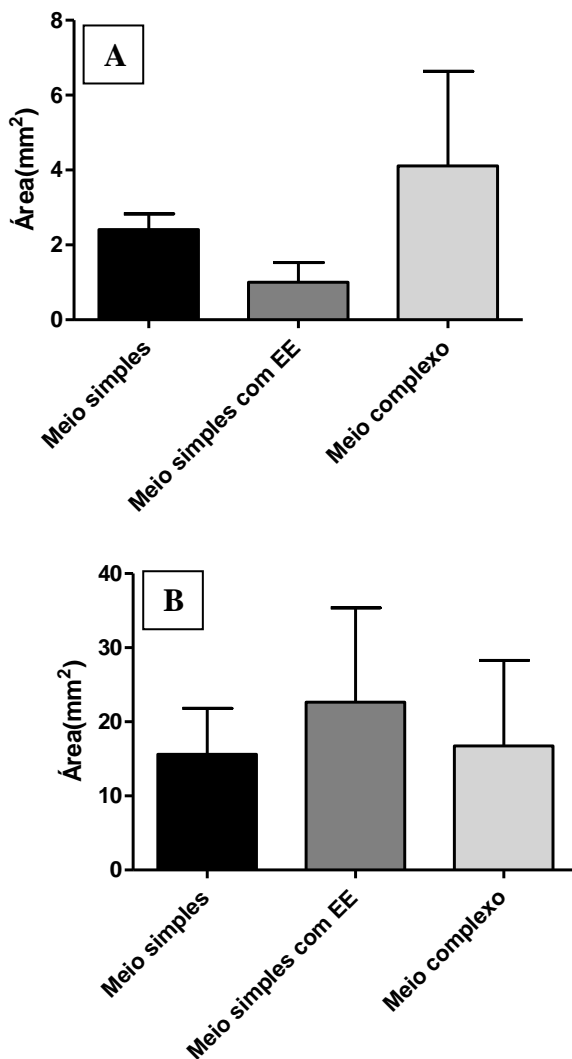


Figura 11. Medida da área do halo de migração/crescimento em explantes com 7 dias, representados pelo gráfico A, e com 14 dias representados pelo gráfico B. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes utilizando uma amostra de cada experimento em cada uma das diferentes condições.

Tanto com 7 como com 14 dias, todas as condições testadas, apresentaram um grande desvio padrão. Nenhum dos resultados encontrados obtiveram $P < 0,05$, necessário para que a diferença estatística seja considerada significativa, demonstrados pela via de ANOVA, comparando os 3 diferentes meios (tabela 4).

Tabela 4. Análise estatística comparando culturas de 7 e 14 dias. Experimento realizado independentemente em triplicata utilizando uma amostra de cada.

Tempo de cultura	P	$P < 0,05$	N
7 Dias	0,400	Não	3
14 Dias	0,882	Não	3

5.3. ANÁLISE DE MARCADORES FENOTÍPICOS POR RT-PCR

A seguir, avaliamos por RT-PCR em culturas de 14 dias mantidas em meio complexo a expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos marcadores de células tronco da crista neural/células tronco neurais (nestina), de melanócitos (TRP-2), e de células epidermais diferenciadas (citoqueratina -14, KRT-14) (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão de marcadores fenotípicos por RT-PCR.

Marcador	Nestina	TRP-2	KRT-14
Expressão em meio complexo	+	+	+
Marcador	CN/Precursor de células neurais	Melanócitos	Queratinócitos em estagio final de diferenciação

Estes resultados sugerem a presença de células com características de crista neural e/ou progenitores neuronais, melanocitos e células epidermais dentre a população de células que migrou a partir dos folículos pilosos para a placa de cultura.

5.4. ANÁLISE DOS MARCADORES FENOTÍPICOS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

a) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14 no folículo piloso íntegro

Com o objetivo de avaliar a localização das células positivas para KRT 14 no folículo piloso íntegro, antes da realização das culturas, folículos pilosos foram isolados e fixados e foi realizada a imunomarcação conforme descrito em materiais e métodos.

Na Figura 12, pode ser observada a presença de células positivas para KRT 14 concentradas na região entre a papila dermal e a saliência do bulge (setas). A marcação foi negativa nas demais regiões do folículo.

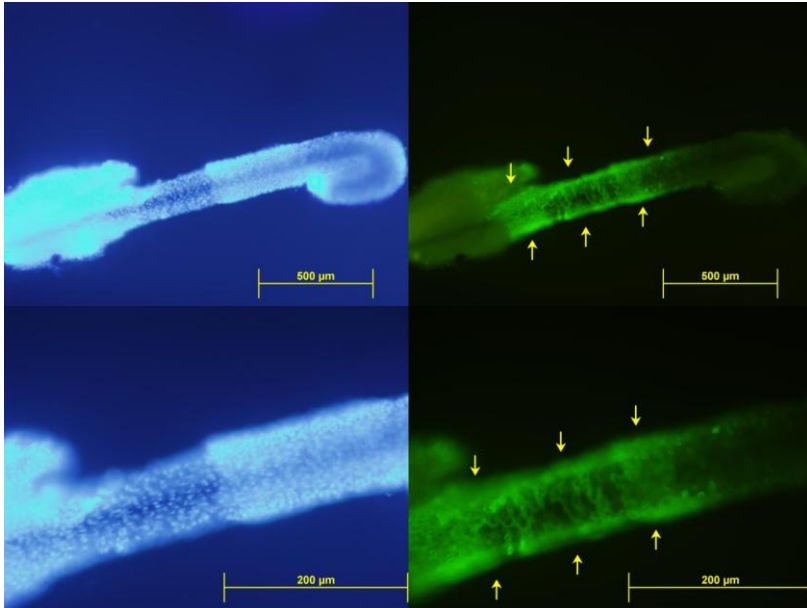


Figura 12. Fotografia representativa de imunofluorescência demonstrando a presença de células positivas para KRT 14 (verde, setas) nos folículos pilosos de camundongo após isolamento. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

b) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14 e nestina em culturas primárias de folículo piloso após 7 dias de cultivo.

No cultivo em meio simples, observamos a presença de células positivas para KRT 14 no explante do folículo, limitando-se à região entre o bulge e a papila dermal, muito semelhante ao folículo íntegro. Nesse período, observamos a migração de células do folículo piloso para a placa de cultura, porém estas foram negativas para KRT 14, como demonstrado na Figura 13.

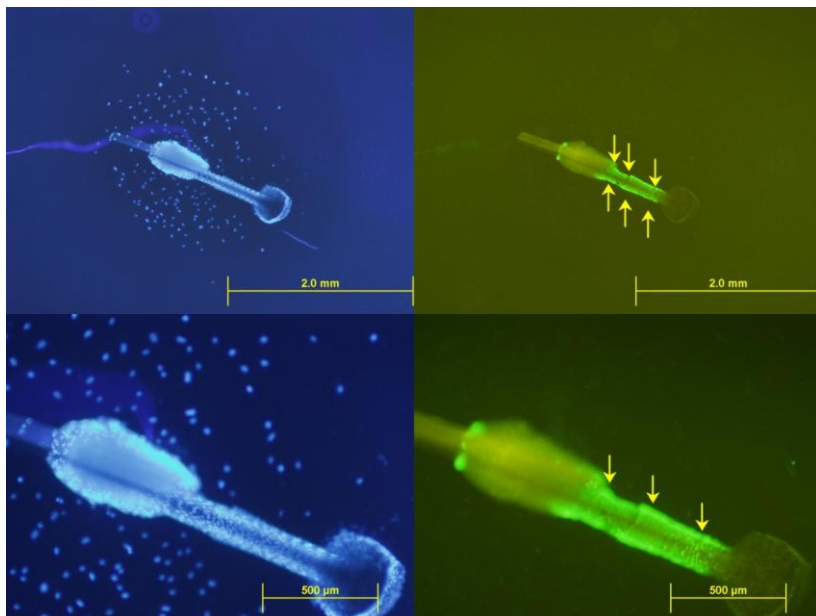


Figura 13. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência demonstrando a presença de células positivas para KRT14 (verde, setas) no explante do folículo piloso após 7 dias de cultivo em meio simples. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) e em verde para a proteína KRT 14, de folículo piloso cultivado sobre placa de cultura tratada com colágeno I utilizando o meio simples em aumento de 40 x e 100 x vezes .

No cultivo em meio simples acrescido de EE, como no meio simples, observamos células positivas para KRT 14 ainda no explante do folículo piloso um pouco além do limite entre o bulge e a papila, porém estas dispersas em quase toda extensão do folículo (Figura 14). Assim como no experimento anterior, a expressão deste marcador é limitada ao explante, não sendo observado nas células que migraram a partir do mesmo.

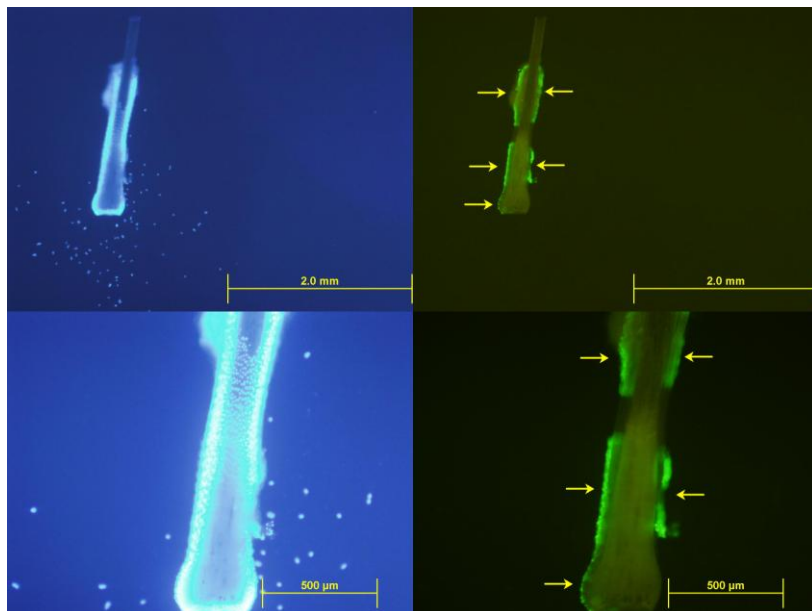


Figura 14. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de folículo piloso demonstrando a presença de células positivas para KRT14 (verde, setas) após 7 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 40 x e 100 x vezes.

Observamos ainda neste meio de cultivo a presença de células positivas para KRT14 na região da papila dermal como uma delgada e sutil linha de células (Figura 15).

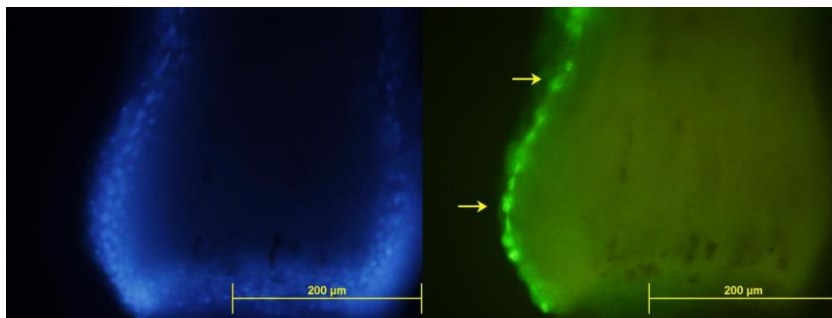


Figura 15. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência da região da papila dermal de folículo piloso aos 7 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE demonstrando a presença de células positivas KRT 14 (verde, setas). O núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) em aumento de 200 x vezes.

A seguir avaliamos a presença de células positivas para KRT14 em culturas mantidas em meio complexo. Observamos em alguns folículos alta migração/crescimento celular a partir do explante. O halo de migração/crescimento das células e a presença de células positivas para KRT 14 foram significativamente maiores que nos demais meios de cultivo. A expressão deste marcador não se limitou ao folículo, marcando também as células que migraram para a placa de cultura (numa proporção de cerca de 15%) (Figura 16). As células positivas para KRT14 apresentavam morfologia achatada e poligonal, semelhante a de queratinócitos em cultura.

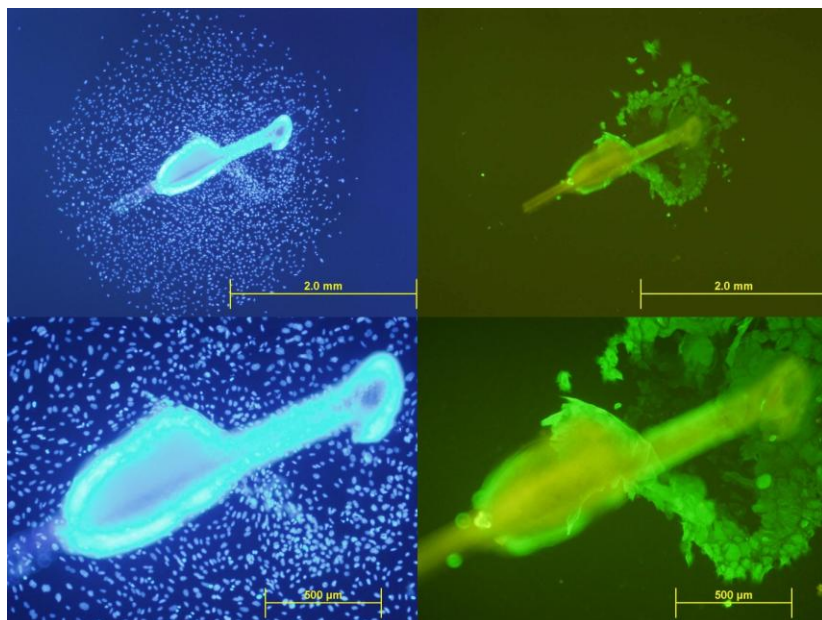


Figura 16. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de folículo piloso aos 7 dias de cultivo em meio complexo demonstrando a presença de células positivas KRT 14 (verde, setas). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 40x e 100x vezes.

Além das células positivas marcadas para KRT14, avaliamos também a presença de células positivas para nestina, nas mesmas condições descritas acima. Quando utilizado o meio simples, observamos que cerca de 15% das células que migraram do explante para a placa de cultura eram positivas para este marcador (Figura 17) . A marcação de nestina foi observada em filamentos citoplasmáticos e perinucleares. As células positivas para nestina apresentaram uma morfologia fusiforme com poucos prolongamentos semelhantes a fibroblastos e a células da crista neural em cultura. Não foi observada marcação para nestina no explante do folículo.

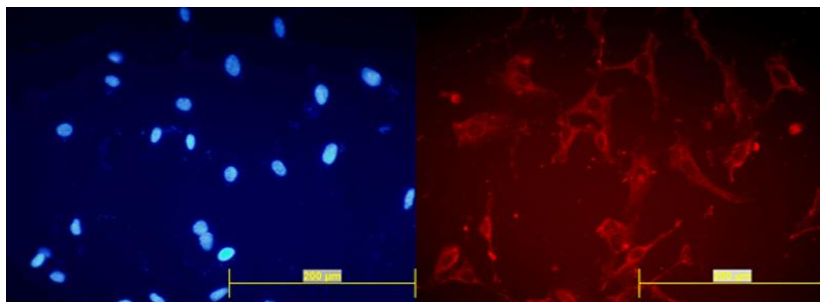


Figura 17. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 7 dias de cultivo em meio simples, demonstrando a presença de células positivas para nestina (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 200x vezes.

Os resultados de marcação para nestina obtidos com meio simples contendo EE (Figura 18) e com meio complexo (Figura 19), foram muito semelhantes ao do no cultivo em meio simples descrito acima.

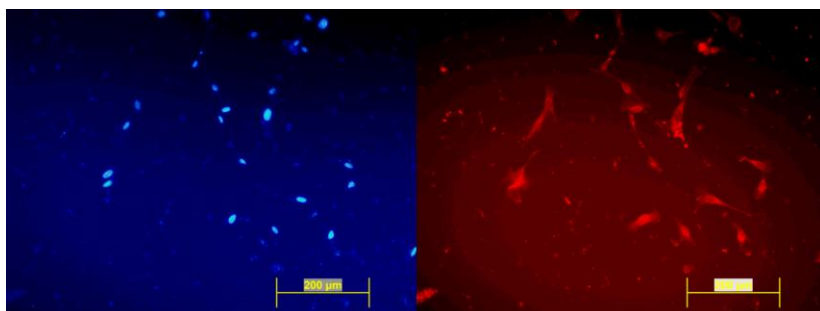


Figura 18. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 7 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE, demonstrando a presença de células positivas para nestina (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x vezes.

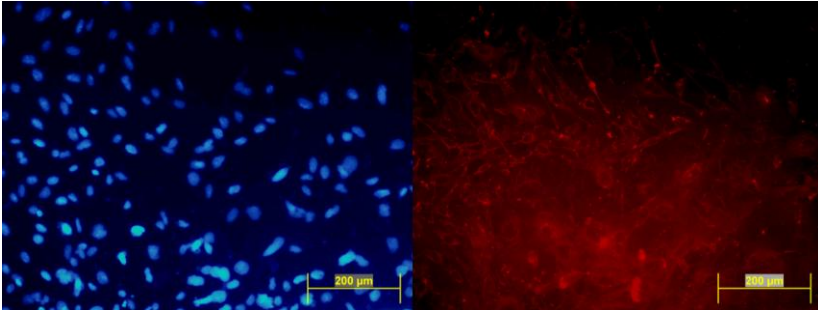


Figura 19. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 7 dias de cultivo em meio complexo, demonstrando a presença de células positivas para nestina (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x vezes .

Não foram observadas células positivas para p75 aos 7 dias de cultivo em nenhum dos meios de cultura utilizados.

c) Avaliação da expressão de células positivas para KRT 14, p75 e nestina em culturas primárias de folículo piloso após 14 dias de cultivo.

No 14^o dia, observamos nas culturas mantidas em meio simples a presença de células positivas para KRT 14 dentre as que migraram do explante. Como pode ser observado na Figura 20, a proporção destas células é pequena (menor que 2%), sendo encontradas próximas à papila dérmica e ao bulge. Não foi mais observada a presença de células positivas para KRT 14 no explante do folículo piloso.

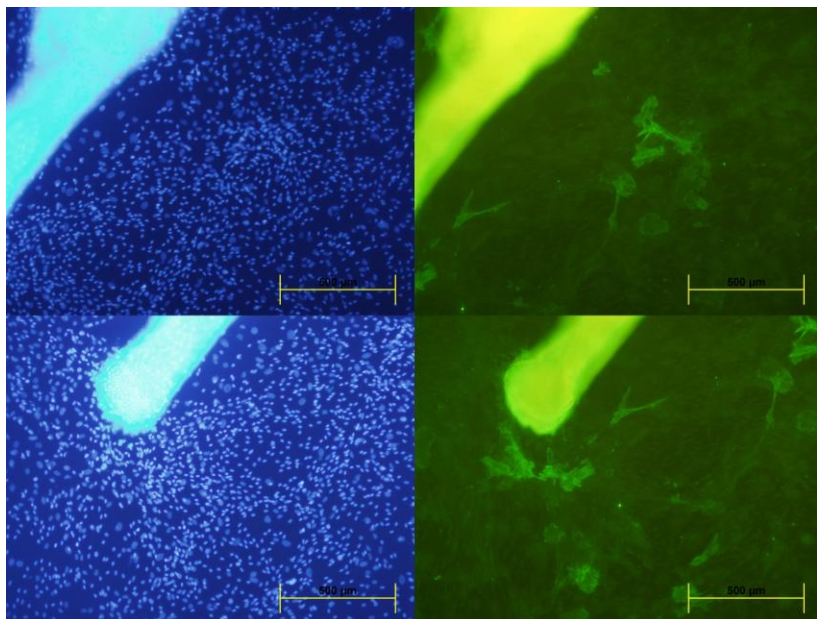


Figura 20. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples, demonstrando a presença de células positivas para KRT 14 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x vezes.

Resultado muito semelhante foi observado quando utilizamos o meio simples acrescido de EE. Apesar das células possuírem uma marcação mais forte, o número de células marcadas foi reduzido (menor que 2%) (Figura 21).

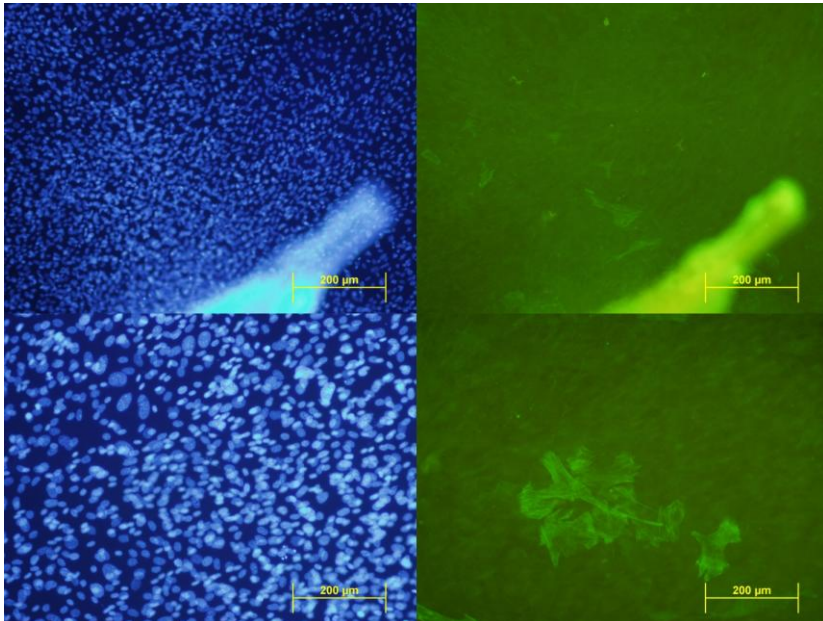


Figura 21. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE, demonstrando a presença de células positivas para KRT 14 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

Os nossos resultados mostram ainda que os explantes cultivados em meio complexo, apresentaram uma proporção de células marcadas para KRT 14 na área de migração do explante mais expressiva que nas demais condições de cultivo (cerca de 15%) (Figura 22).

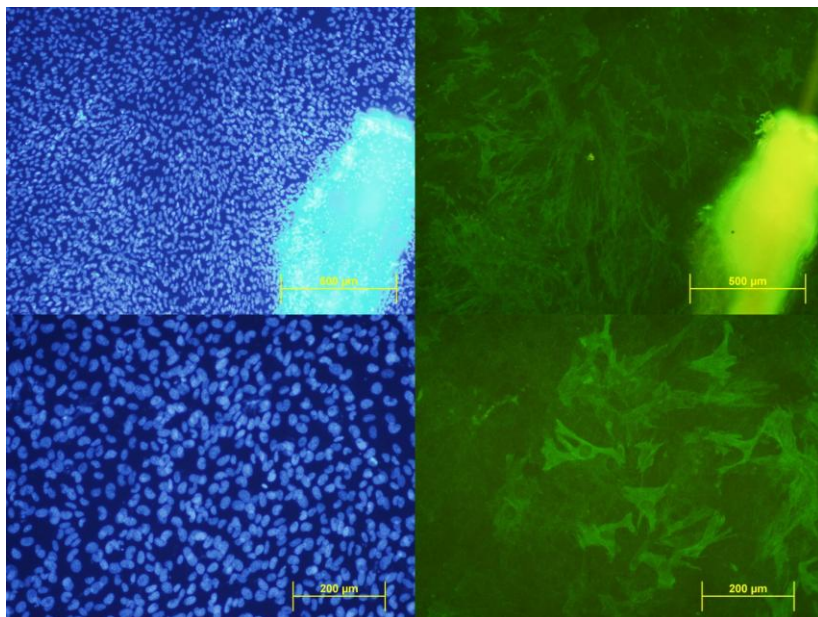


Figura 22. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio complexo, demonstrando a presença de células positivas para KRT 14 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

Avaliamos também, aos 14 dias de cultivo a presença de células positivas para nestina. Verificamos que a proporção de células marcadas positivamente para nestina aumentou significativamente nesse período. Verificamos que nas três condições de cultivo mais de 90% das células expressavam esse marcador. No meio simples (Figura 23), as células apresentaram morfologia com poucos prolongamentos com distribuição citoplasmática dos filamentos de nestina homogênea.

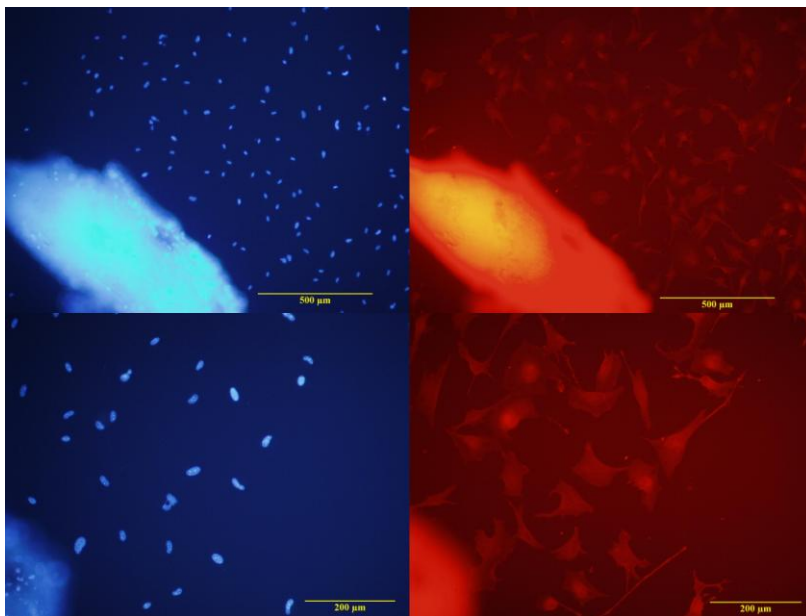


Figura 23. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples, demonstrando a presença de células positivas para nestina (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes .

No meio simples contendo EE, a morfologia das células apresentou-se mais alongada, com prolongamentos maiores (Figura 24). A frequência também se manteve alta da mesma forma que a condição anterior.

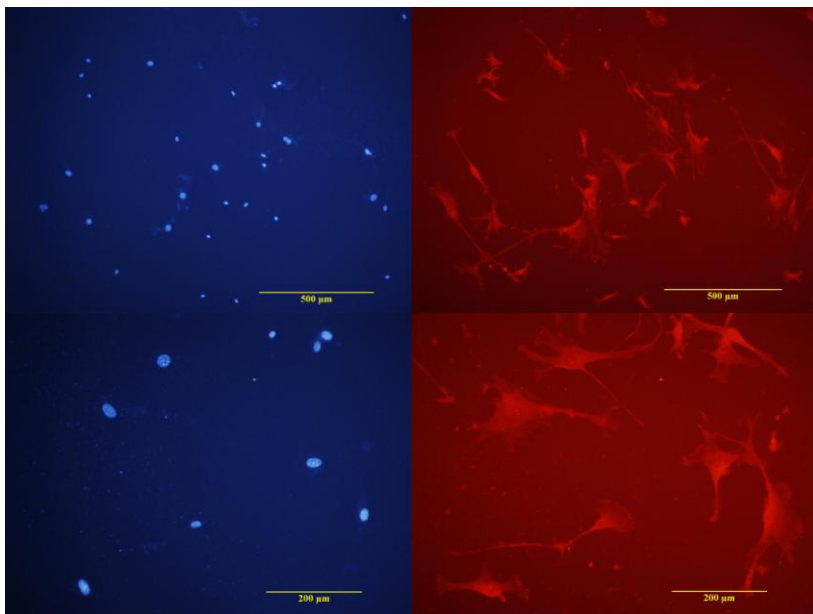


Figura 24. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE, demonstrando a presença de células positivas para nestina (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

Na condição utilizando o meio complexo (Figura 25), as células mantiveram a morfologia mais semelhante a encontrada no meio simples com EE e da mesma forma que nas condições anteriores, a proporção de células positivas para nestina também se manteve maior que 90%.

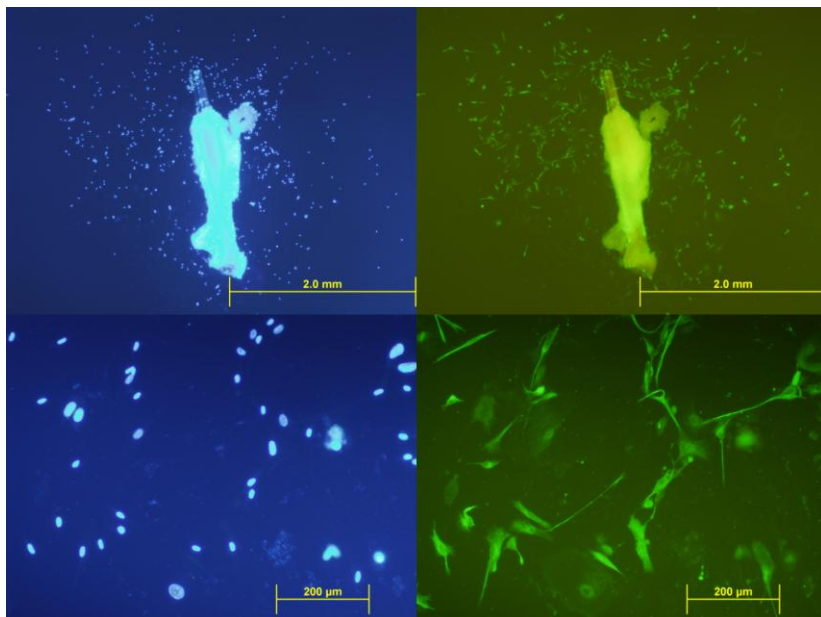


Figura 25. Fotografia ilustrativa da cultura com 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo. As células marcadas em verde são positivas para nestina. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 40x e 100x vezes.

Além das marcações para KRT 14 e nestina, avaliamos também a presença da proteína p75, considerado marcador das células de crista neural indiferenciadas. Observamos a presença de uma baixa proporção de células positivas para p75 na área de migração do explante nos três meios de cultura utilizados (Figuras 26 a 28).

Em meio simples, observamos uma baixa proporção de células positivas para p75 (cerca de 4%) (Figura 26). Assim como as células positivas para nestina, estas apresentaram morfologia muito semelhante às das células da crista neural em cultura.

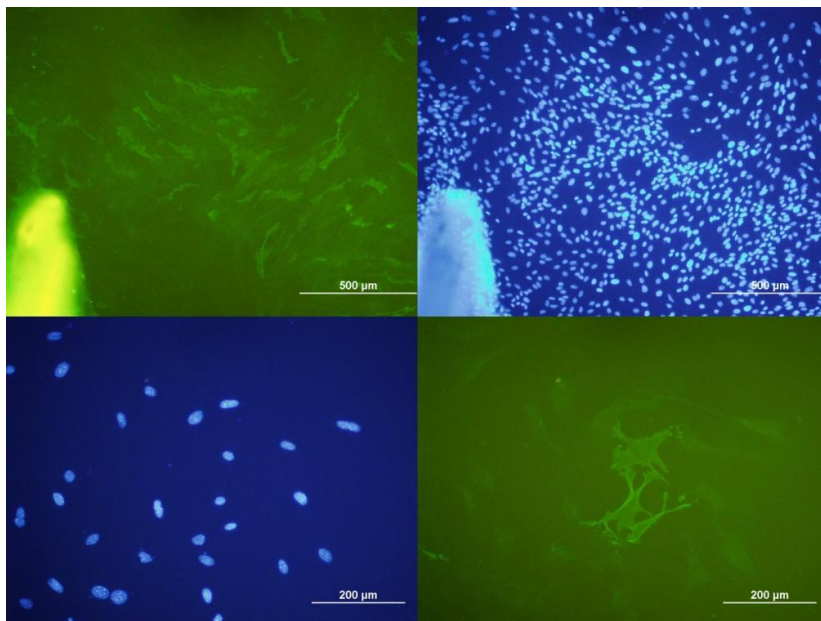


Figura 26. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples, demonstrando a presença de células positivas para p75 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

Resultado semelhante foi obtido na condição de meio simples acrescido de EE, tanto referente à proporção de células marcadas para p75, à morfologia encontrada (Figura 27).

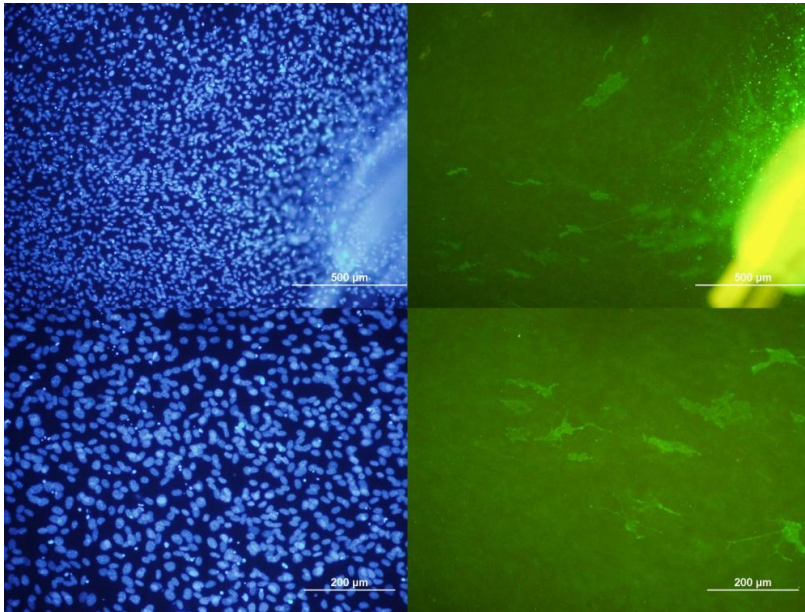


Figura 27- Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio simples acrescido de EE, demonstrando a presença de células positivas para p75 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

Na condição de meio complexo, a proporção de células marcadas para p75 foi menor que nas anteriores (menor que 2% de células) (Figura 28), porém a morfologia não foi alterada.

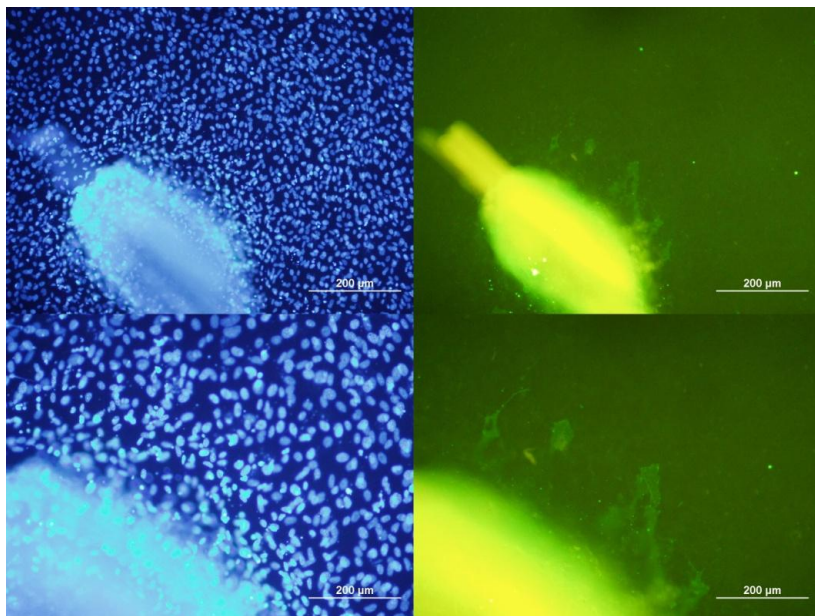


Figura 28. Fotografia ilustrativa de imunofluorescência de culturas de folículos piloso com 14 dias de cultivo em meio complexo, demonstrando a presença de células positivas para p75 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) em aumento de 100x e 200x vezes.

5.4- ANÁLISE DOS EFEITOS DE SONIC HEADHOG (SHH) SOBRE AS CÉLULAS POSITIVAS PARA NESTINA E KRT14

Tendo em vista os resultados anteriores, analisamos a seguir um possível efeito da adição de SHH ao meio complexo na expressão de células positivas para p75, KRT14 e nestina aos 14 dias de cultivo. Foram realizados 3 ensaios em triplicata, onde a concentração utilizada de SHH foi de 10 nM e 100nM como descrito em materiais e métodos.

Ao analisarmos o halo de migração/crescimento, verificamos uma variação de área entre os explantes, porém sem diferença significativa entre as condições experimentais avaliadas (Figura 29).

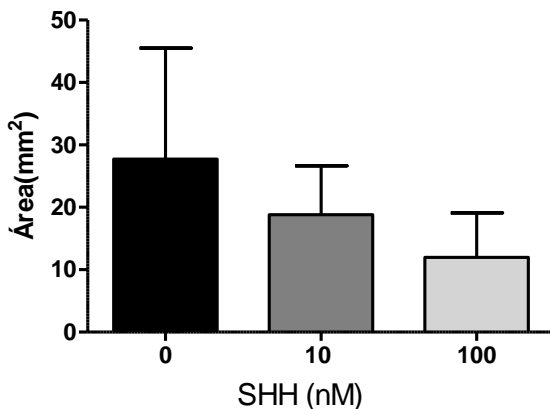


Figura 29. Análise dos efeitos de SHH na área do halo de migração/crescimento aos 14 dias.

Diferentemente do que foi observado na marcação para KRT14 com meio complexo (Figura 22), a proporção de células positivas para este marcador foi reduzida após a adição de 10nM de SHH (Figura 30). Porém as células mantiveram a morfologia semelhante à de queratinócitos encontrada nas condições testadas anteriormente. Não observamos marcação nas células no explante do folículo piloso.

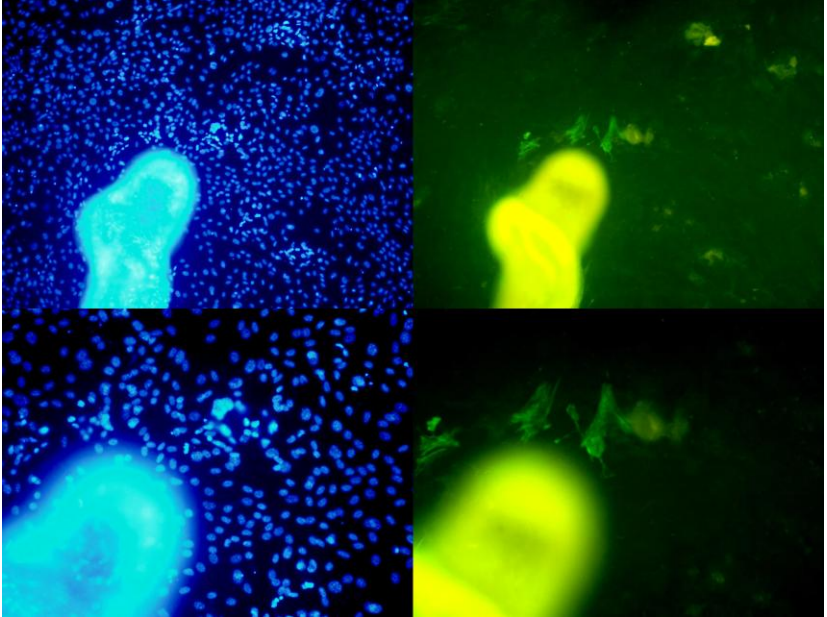


Figura 30. Fotografia ilustrativa da cultura de 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo contendo 10nM de SHH. As células marcadas em verde são positivas para KRT14. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 100x e 200x vezes.

No cultivo com 100nM de SHH, observamos células positivas para KRT14 tanto no explante do folículo piloso (Figura 31), quanto nas células que migraram para a placa de cultura (Figura 32). A proporção de células com marcação positiva pra KRT14 que migraram do explante foi baixa, diferente do observado no explante (Figura 31). Não observamos marcação de KRT14 simultaneamente no folículo e nas células que migraram para a placa de cultura.

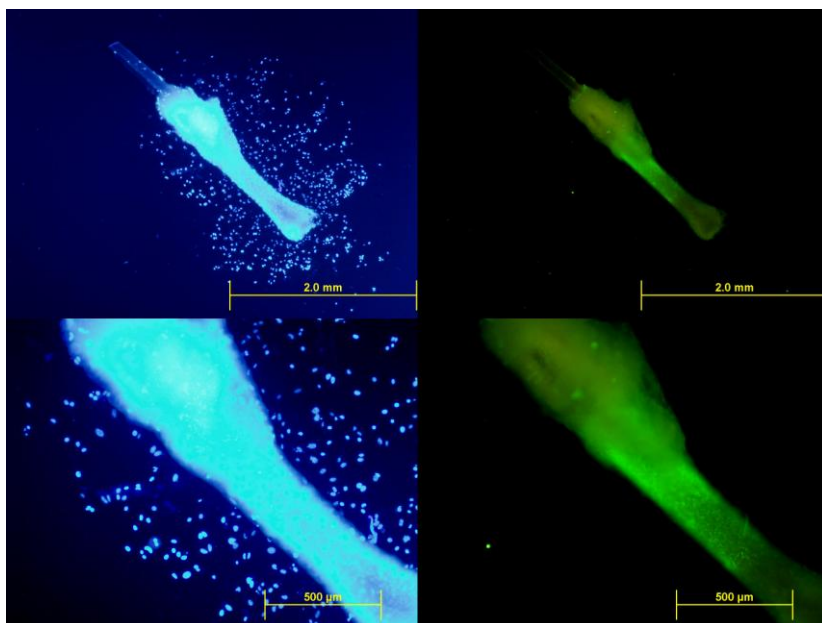


Figura 31. Fotografia ilustrativa da cultura de 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo contendo 100nM de SHH. As células no explante marcadas em verde são positivas para KRT14. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 40x, 100x e 200x vezes.

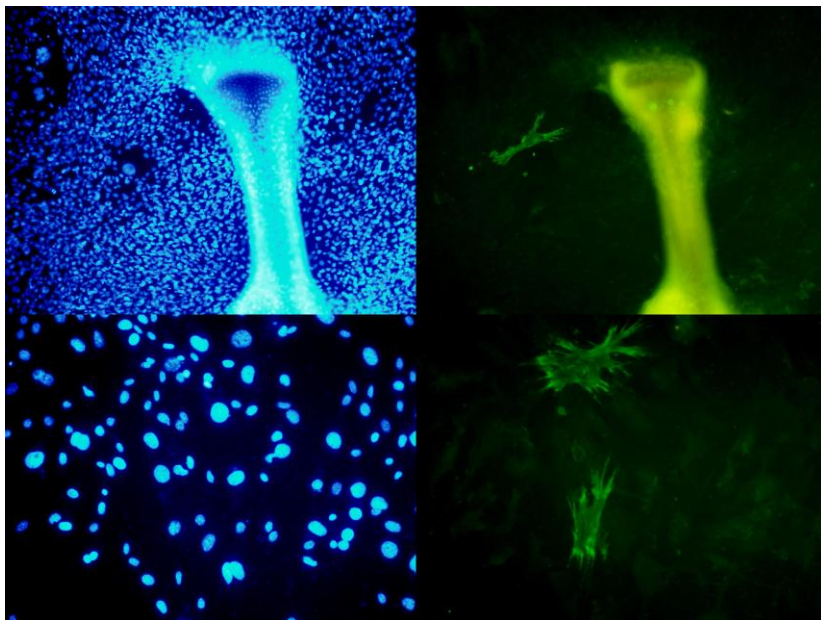


Figura 32. Fotografia ilustrativa da cultura de 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo contendo 100nM de SHH. As células marcadas em verde que migraram para a placa, são positivas para KRT14. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 100x e 200x vezes.

Observamos na cultura mantida em meio contendo 10nM de SHH, uma alta concentração de células positivas para nestina (mais de 90% das células). Porém nesta condição as células apresentaram uma morfologia um pouco diferente da condição controle (Figura 25) e adquiriram uma morfologia mais poligonal sendo abundantes em volta de todo o explante (Figura 33).

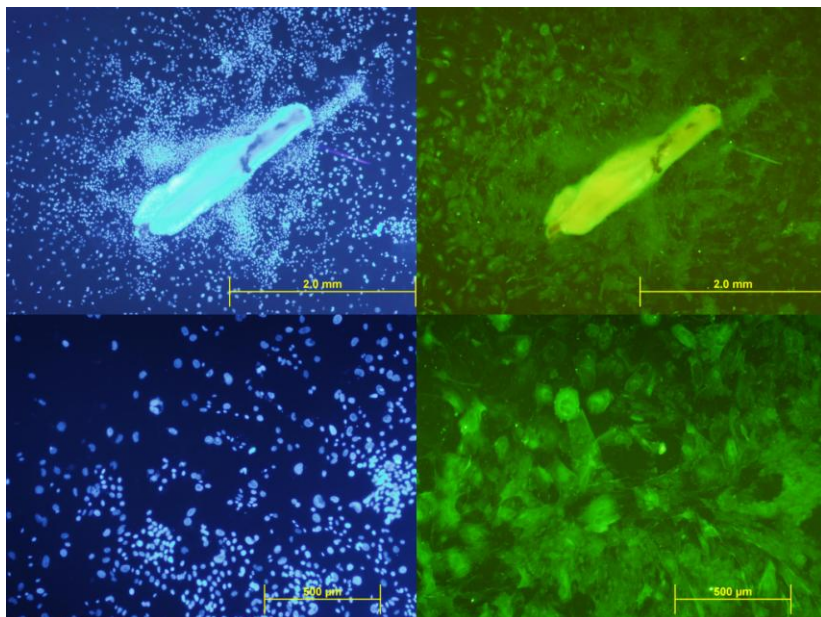


Figura 33. Fotografia ilustrativa da cultura com 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo contendo 10nM de SHH. As células marcadas em verde são positivas para nestina. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 40x e 100x vezes.

Na presença de 100nM de SHH, a proporção de células positivas para nestina também foi abundante (maior do que 90%) (Figura 34), porém a morfologia apresentada foi heterogênea. Observamos tanto células achatadas como demonstrado na Figura 33, como também células mais fibroblastoide semelhantes as encontradas na condição controle (Figura 25).

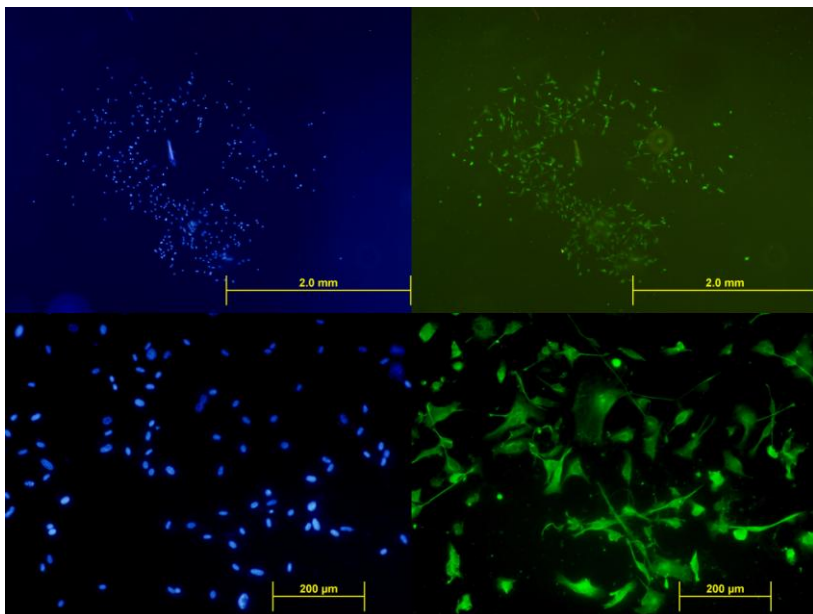


Figura 34- Fotografia ilustrativa da cultura com 14 dias de folículo piloso sobre colágeno I utilizando meio complexo contendo 100nM de SHH. As células marcadas em verde são positivas para nestina. Os núcleos foram corados com DAPI e encontram-se em azul em aumento de 40x e 200x vezes.

Não foi observada marcação de p75 na presença de SHH em nenhuma das concentrações avaliadas.

A tabela abaixo, resume as marcações de imunofluorescência em todas os meios de cultura testados (tabela 5).

Tabela 5. Resumo das marcações encontradas por análise de imunofluorescência com meios simples, simples com EE, meio complexo e com a adição de 10nM e 100nM de Shh ao meio complexo.

	7 dias			14 dias		
	KRT14	Nestina	p75	KRT14	Nestina	p75
<i>Meio simples</i>	Marcou apenas células do FP	Marcou apenas as células que migraram	-	Marcou as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram
<i>Meio simples c/ EE</i>	Marcou apenas células do FP	Marcou apenas as células que migraram	-	Marcou as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram
<i>Meio complexo</i>	Marcou células do FP e que migraram	Marcou apenas as células que migraram	-	Marcou as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram	Marcou apenas as células que migraram
<i>Meio com 10nM de Shh</i>	-	-	-	Marcou as células que migraram	Marcou as células que migraram	-
<i>Meio com 100nM de Shh</i>	-	-	-	Marcou as células que migraram	Marcou as células que migraram	-

6- DISCUSSÃO

Neste trabalho foram apresentados dados para cultura de folículo piloso em forma de explante com protocolo de cultivo similar ao realizado por Sieber-blum e colaboradores de 2004. Em nossas culturas, as células apresentaram uma característica migratória similar a encontrada em culturas primárias de células de crista neural com células migrando a partir do explante aderido à placa de cultura. Em todas as condições experimentais avaliadas observamos grandes variações experimentais, principalmente em relação à área do halo de migração/crescimento e em relação à heterogeneidade da população celular que apresentou diferenças fenotípicas.. Estes resultados sugerem uma alta heterogeneidade entre folículos pilosos nas culturas de explante *in vitro*. Estes resultados são similares à cultura de explantes de tubo neural para obtenção das células da crista neural embrionária (Trentin et. Al, 2004, Costa-Silva, 2009).

6.1- HALO DE MIGRAÇÃO/CRESCIMENTO

Nossas culturas apresentaram formação de agrupamentos celulares que cresceram em volta dos explantes a partir dos dias 3 e 4 de cultivo. Observamos um aumento significativo na área do halo de migração/crescimento a partir dos dias 7 e 8 de cultivo. Este padrão se manteve em todas as condições testadas demonstrando que os meios de cultura utilizados não interferem no padrão de migração destas células do explante de folículo piloso para a placa de cultura, e nem na proliferação destas células. No entanto, o desvio padrão obtido nos experimentos foi alto em todas as condições, sugerindo heterogeneidade dos explantes em cultura. Estes resultados foram observados tanto aos 7 dias de cultura como também aos 14 dias, e nos diferentes meios de cultivo.

É possível que fatores regulatórios do próprio folículo piloso estejam contribuindo para esse resultado. A exemplo disto podemos citar a papila dermal, descrita como uma região

regulatória tanto nos estágios do desenvolvimento embrionário, como também em estágios pós natal. Terskikh, e colaboradores (2010), demonstraram que a papila dermal atua diretamente na diferenciação e proliferação de queratinócitos em cultura de folículos pilosos humanos.

6.2- MARCADORES DE CRISTA NEURAL.

Corroborando os resultados demonstrados pelo grupo de Sieber-Blum, encontramos células com marcação positiva para proteínas consideradas marcadores de células de crista neural indiferenciadas como p75 e também nestina (Olga Shakhova & Lukas Sommer, 2010) Esta última também é considerado marcador de células progenitoras neurais (Lendahl, Zimmerman et al. 1990). Células positivas para p75 foram encontradas somente nas culturas mais longas de 14 dias. Porém diferentemente das células positivas para KRT 14, as positivas para p75 não foram observadas no explante, sugerindo que as células semelhantes à crista neural possuem uma migração do explante para a placa de cultura em estágios mais tardios em cultivo. Resultados semelhantes foram demonstrados por Miller e colaboradores (2010), que demonstraram que células da papila dermal de folículo piloso de camundongos possuem características tanto de células neurais como também da crista neural. Esta população específica de células foi chamada pelo autor de precursoras derivadas da pele.

Observamos também a expressão de RNAm de nestina aos 14 dias de cultura em meio complexo. Este resultado foi reforçado pela marcação imunocitoquímica de nestina nas mesmas condições aos 7 e 14 dias de cultura. A adição de SHH não alterou esse resultado. Estes dados sugerem que as células que migram do folículo piloso possuem características de células da crista neural. Esses achados podem ser importantes do ponto de vista terapêutico e biotecnológico, uma vez que Amoh, Li e colaboradores de 2008, sugerem que células provenientes de folículo piloso positivas para nestina atuam no reparo de lesões da medula espinhal.

Nossos resultados sugerem ainda que o folículo piloso de animais adultos mantém algumas características de tecidos embrionários da crista neural como demonstrado pela marcação de p75 e nestina, abrindo um leque para estudos posteriores buscando outros tipos celulares derivadas de crista neural além da de células neuronais como citado acima.

6.3- MARCADORES DE PRECURSORES EPIDERMIS

Para linhagem de células epidermais, encontramos marcação para KRT14 e TRP2 que são marcadores de células precursoras epiteliais em estágio final de diferenciação e melanócitos, respectivamente. Estas marcações foram observadas aos 14 dias de cultura pela análise de expressão de RNAm por RT-PCR em meio complexo. A expressão de KRT14 ainda foi confirmada por análise de imunofluorescência onde foi encontrada marcação positiva em todas as condições testadas.

As células positivas para KRT14 apresentaram morfologia diferente das células marcadas para nestina e p75, sugerindo que uma população heterogênea de células migra do explante do folículo piloso. Fuchs e colaboradores (2007) sugerem que células do bulge são capazes de se diferenciar em todas linhagens epidermais. Segundo este mesmo grupo, estas células possuem capacidade de autorrenovação e multipotencialidade reforçando nossos resultados. Podemos sugerir, com base na presença dos marcadores e morfologia, que as células positivas KRT14, representem queratinóticos e as células que expressam nestina e p75 correspondam às células semelhantes à crista neural.

A marcação para KRT14 foi encontrada em todos as condições de cultivos analisados, além do folículo integro recém isolado do tecido (Figura 12). Porém nos estágios iniciais de cultura (7 dias), as células positivas para KRT14 esteve presente apenas no explante do folículo, não sendo encontrada nas células que migraram para a placa de cultura, com exceção da cultura em meio complexo, que mesmo aos 7 dias de cultivo

apresentou células com esta marcação na placa de cultura (Figura 12). Todas as condições de cultura apresentaram marcação de KRT14 nas células que migraram do explante aos 14 dias. Estes dados sugerem que as células KRT14 positivas, demoram mais para migrar do explante do que as nestina positivas e que fatores presentes no meio complexo estimulam esse processo. É importante mencionar que o fato de estas células estarem localizadas em diferentes regiões do folículo piloso (Figuras 12,13,14 e 15) sugere uma localização destas células, distribuídas em todo folículo piloso. Primeiramente presentes apenas na haste entre a papila dérmica e o bulge, e posteriormente também sendo expresso nestes 2 até que estas células iniciem sua migração e adesão para a placa de cultivo. Um resultado semelhante também foi demonstrado em cortes histológicos (Zcharia, Philp et al. 2005). Este mesmo grupo sugere que estas células sejam reguladas pela atividade da enzima heparanase que degrada o heparan sulfato que funciona como uma barreira da matriz extracelular. Com a quebra desta molécula a célula torna-se apta a ativação via fatores específicos, inclusive controlando desta forma o ciclo celular. Em folículos pilosos humanos, Bernard e Thibaut (2008) demonstraram que a presença de inibidores de heparanases regulam a expressão de células KRT14 positivas, mostrando que estas células localizam-se em regiões onde há atividade desta enzima. Estes resultados podem indicar que em nossos experimentos, as células também sejam controladas por fator(es) secretado(s) pelo folículo piloso que de acordo com sua expressão controlam a localização das células com marcação para KRT14.

Desse modo, a presença de células positivas para KRT14 tanto no folículo piloso como na placa de cultura, confirmam a hipótese de que o folículo piloso contenha células com potencial para diferenciação epidermal, representando uma fonte acessível destas células para utilização terapêutica.

6.4- EFEITO DE SHH

Obtivemos uma melhor eficiência no cultivo das células do folículo piloso de vibrissas de camundongos com a utilização do meio complexo. Desse modo, avaliamos o efeito da adição de SHH a esse meio sobre a migração/crescimento e expressão fenotípica em culturas de 14 dias. SHH é essencial para o desenvolvimento do folículo piloso, como demonstrado por Dlugusz e colaboradores (1999), porém seus efeitos ainda não foram totalmente elucidados. Este mesmo trabalho demonstrou que animais nocautes para o gene de SHH não possuem pêlos, sugerindo um envolvimento direto do SHH na formação dos folículos pilosos. Além disso, SHH parece ter uma influência direta sobre os progenitores multipotentes neuromesectodermais da crista neural embrionária em aves (Calloni et al. 2007, 2009). Apesar dos resultados acima demonstrando a ação de SHH em células da crista neural e de linhagens epidermais, este morfógeno não apresentou efeito em nossas condições de cultivo. As culturas mantidas nas duas concentrações utilizadas de SHH apresentaram características semelhantes às mantidas em meio complexo.

7- CONCLUSÃO

Com estes resultados sugerimos que o folículo piloso é uma região com heterogeneidade celular, demonstrado pela caracterização dos diferentes fenótipos celulares. Fenótipos derivados de crista neural representados pelos marcadores p75 e Nestina, necessitam de um tempo de cultivo um pouco mais longo para migrar para a placa de cultura. Observamos marcação de fenótipos epidermais como KRT14 em todas as condições testadas, demonstrando que este é um marcador presente em todas as fases observadas. E o TRP2 com 14 dias de cultura por expressão de mRNA em meio complexo.

O meio complexo se mostrou mais eficiente que os demais, aumentando o número de fenótipos epidermais visualizado pela marcação de KRT14. O meio contendo SHH não se mostrou eficiente para alteração da culturas em todas as condições testadas.

8- REFERÊNCIAS

Alison, M. R. and S. Islam (2009). "Attributes of adult stem cells." The Journal of Pathology **217**(2): 144-160.

Amoh, Y., L. Li, et al. (2008). "Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function." Cell Cycle **7**(12): 1865-1869.

Blanpain, C. and E. Fuchs (2006). "Epidermal stem cells of the skin." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 339-373.

Blanpain, C. and E. Fuchs (2009). "Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(3): 207-217.

Blanpain, C., V. Horsley, et al. (2007). "Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves." Cell **128**(3): 445-458.

Calloni, G. W., C. Glavieux-Pardanaud, et al. (2007). "Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(50): 19879-19884.

Calloni, G. W., N. M. Le Douarin, et al. (2009). "High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(22): 8947-8952.

Chiang, C., R. Z. Swan, et al. (1999). "Essential Role for Sonic hedgehog during Hair Follicle Morphogenesis." Developmental Biology **205**(1): 1-9.

Christiano, A. M. (2004). "Epithelial Stem Cells: Stepping out of Their Niche." Cell **118**(5): 530-532.

Costa-Silva, B., M. C. da Costa, et al. (2009). "Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential." Exp Cell Res **315**(6): 955-967.

Crowe, R., D. Henrique, et al. (1998). "A new role for Notch and Delta in cell fate decisions: patterning the feather array." Development **125**(4): 767-775.

Dupin, E., G. W. Calloni, et al. (2010). "The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities." Cell Cycle **9**(2): 238-249.

El Seady, R., M. A. Huisman, et al. (2008). "Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia." Biochemical and Biophysical Research Communications **376**(2): 358-362.

GILBERT, Scott F. **Biologia do desenvolvimento**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 563p. ISBN 8587528173

Houghton, L., C. Lindon, et al. (2005). "The ectodysplasin pathway in feather tract development." Development **132**(5): 863-872.

Hu, Y. F., Z.-J. Zhang, et al. (2006). "An Epidermal Neural Crest Stem Cell (EPI-NCSC) Molecular Signature." STEM CELLS **24**(12): 2692-2702.

Jaks, V., N. Barker, et al. (2008). "Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells." Nat Genet **40**(11): 1291-1299.

Le Douarin, N. M., G. W. Calloni, et al. (2008). "The stem cells of the neural crest." Cell Cycle **7**(8): 1013-1019.

Le Douarin, N. M. and E. Dupin (2003). "Multipotentiality of the neural crest." Current Opinion in Genetics & Development **13**(5): 529-536.

- Legué, E. and J.-F. Nicolas (2005). "Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors." Development **132**(18): 4143-4154.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman, et al. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell **60**(4): 585-595.
- Lorz, C., R. García-Escudero, et al. (2010). "A Functional Role of RB-Dependent Pathway in the Control of Quiescence in Adult Epidermal Stem Cells Revealed by Genomic Profiling." Stem Cell Reviews and Reports **6**(2): 162-177.
- Morris, R. J., Y. Liu, et al. (2004). "Capturing and profiling adult hair follicle stem cells." Nat Biotechnol **22**(4): 411-417.
- Noramly, S., A. Freeman, et al. (1999). "beta-catenin signaling can initiate feather bud development." Development **126**(16): 3509-3521.
- Ohyama, M. (2007). "Hair follicle bulge: A fascinating reservoir of epithelial stem cells." Journal of Dermatological Science **46**(2): 81-89.
- Ohyama, M., A. Terunuma, et al. (2006). "Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells." The Journal of Clinical Investigation **116**(1): 249-260.
- Oshima, H., A. Rochat, et al. (2001). "Morphogenesis and Renewal of Hair Follicles from Adult Multipotent Stem Cells." Cell **104**(2): 233-245.
- Sieber-Blum, M., M. Grim, et al. (2004). "Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle." Developmental Dynamics **231**(2): 258-269.
- Rossant, J. & Tam, P., T.. *Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis* (2002) 2^a ed. V.1. Academic Press

Trentin, A., C. Glavieux-Pardanaud, et al. (2004). "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 **101**(13): 4495-4500.

Tumbar, T., G. Guasch, et al. (2004). "Defining the epithelial stem cell niche in skin." Science **303**(5656): 359-363.

Watt, F. M. and K. B. Jensen (2009). "Epidermal stem cell diversity and quiescence." EMBO Molecular Medicine **1**(5): 260-267.

Yamada, T., H. Akamatsu, et al. (2010). "Melanocyte stem cells express receptors for canonical Wnt-signaling pathway on their surface." Biochemical and Biophysical Research Communications **396**(4): 837-842.

Yang, C.-C. and G. Cotsarelis (2010). "Review of hair follicle dermal cells." Journal of Dermatological Science **57**(1): 2-11.

Zcharia, E., D. Philp, et al. (2005). "Heparanase Regulates Murine Hair Growth." The American Journal of Pathology **166**(4): 999-1008.