

Raul Bardini Bressan

**CARACTERIZAÇÃO E EXPANSÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS  
TRONCO EPIDERMIS DERIVADAS DA CRISTA NEURAL)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao  
Centro de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Gonçalves Trentin  
Coorientadora: Msc. Fernanda Rosene Melo

Florianópolis  
2013

Bressan, Raul Bardini

Caracterização e expansão in vitro de células tronco epidermais derivadas da crista neural / Raul Bardini Bressan ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin ; co-orientadora, Fernanda Rosene Melo. - Florianópolis, SC, 2013.

81 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. células tronco. 3. cultivo celular. 4. crista neural. I. Gonçalves Trentin, Andréa . II. Rosene Melo, Fernanda. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Raul Bardini Bressan

**CARACTERIZAÇÃO E EXPANSÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS  
TRONCO EPIDERMIS DERIVADAS DA CRISTA NEURAL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 09 de julho de 2013.

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Risoleta Freire Marques, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Andréa Gonçalves Tretin, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Evelise Maria Nazari, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Giordano Wosgrau Calloni, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho à minha querida  
amiga Tammy pela conversa no  
ônibus do dia 08 de março de 2008.



## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos. A parte mais legal do trabalho. Free-style. Queria escrever em comic sans, mas acho que é too much. É uma parte complicada também. Difícil mostrar toda minha gratidão às pessoas que tanto me ajudaram a realizar esse trabalho e a longa jornada de 5 anos de graduação. Lembro nesse momento de uma simpática senhora no congresso de Biologia Celular em 2010. A querida me ensinou que mais de 90% do trabalho que chamamos de nosso é, na verdade, resultado do trabalho de outras pessoas. True story, bro!

Por favor, não fiquem chatiados caso eu não consiga expressar adequadamente o quanto eu sou grato ou caso eu esqueça de alguém eventualmente.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Pai do céu, seja lá qual for o Seu nome. Muitíssimo obrigado pela ajuda incondicional e pelos milagres operados na minha vida, desde passar no vestibular até entregar esse trabalho a tempo. Deus é mais!

Aos meus pais, Leni e Pedro, e meus irmãos, Rangel e Renan, por todo amor, apoio, dedicação, e financiamento. Muitíssimo obrigado também às minhas cunhadas, Paula e Mari, pela amizade e companheirismo e por fazerem de mim um tio (em breve padrinho também) tão orgulhoso. Amo vocês!

À minha queridíssima orientadora, Prof<sup>a</sup> Andréa Trentin, por todos os valiosos ensinamentos ao longo desses 3 anos de laboratório. Muito obrigado também pela paciência, pelas bolsas de estudo, cartas de recomendação e tudo mais. Faça minhas as tuas palavras. Te devo a alma. Apesar de você me chamar de traidor e de estrelinha, eu sei que você me adora. Saiba que esse sentimento é recíproco.

Aos demais professores do laboratório, Prof<sup>o</sup> Márcio, Prof<sup>o</sup> Giordano e Prof<sup>o</sup> Ricardo, por terem me acolhido e pelos os ensinamentos.

Aos melhores colegas de laboratório ever (corro sério risco de esquecer de alguém aqui): Abdeli (adooro), Aloisio (sábio), Ana (morAngo), Bia (D1v4), Bianca (Rakelly), Bibiane (Gisele), Bruna (like a shell), Camila (consultora), Denise (preservada), Diego (bestie), Diana (D1v4), Fernanda (descabelada), Gabriel (roubou minha bancada!!) , Mari (simpática), Meline (acrobática), Michele (magérrima, linda!), Mábia (roubou minha bancada também!), Patricia (parceira), Priscilla (aloka), Rafaela (miss u btw) Silvia (bestie), Talita (biurifu). Trabalhar com todos vocês é sensacional. Aos eventuais esquecidos, I'm so sorry. Sou muito grato a vocês também, apenas não recordei seus nomes. Não me julguem, escrever um TCC é algo que exige muito da minha capacidade mental.

Gostaria de agradecer em particular aos coleguinhas que contribuíram mais diretamente a esse trabalho:

- Denise, por ter me acolhido with arms wide open quando entrei no lab, pela dedicação e paciência em me ensinar praticamente tudo (da imuno à lavagem do descarte), e pela parceria na realização desse trabalho. Muito obrigado!
- À Patricia, newbie, que tanto contribuiu para a finaleira do trabalho. Owe you 1!
- Fernanda, melhor co-orientadora de todas. Sempre solícita. Muito obrigado pela ajuda na bancada, no fluxo, na vida, nas valiosas discussões dos experimentos e dos resultados. Valeu pela paciência, por me aturar, por não me bater quando eu joguei os teus tubos neurais fora. Te amo sua lynda!
- Silvia Rio, pelas valiosas aulas de biomol, de PCR, pelas correções de resumos, pela incrível amizade, pelos rolê together (espero muitos outros ainda venham. Na Europá de preferência). Se não fosse pelo teu estranho gosto por galochas de andar no banhado eu diria que você é PFTA. Bestie 4ever!
- Talira, lembra que eu prometi um parágrafo exclusivo nos agradecimentos pra ti?? Vc merece um capítulo inteiro na real. Sou extremamente grato por tudo. Por todos os intermináveis questionamentos que me fizeram sentir como se não soubesse nada (perhaps, the truth...), pelos ensinamentos científicos e para a vida, pelo exemplo de bom senso e de profissionalismo, por sempre estar ali presente pra dizer onde se encontra a alíquota disso ou o estoque daquilo. Você não é apenas beautiful. Você é gorgeous! Parabéns Rafael!
- Ana Paula e ao Profº Rodrigo Bairy, pela ajuda (e que ajuda) com os experimentos de *western blot*. Ana, solicitude e simpatia em pessoa, quando crescer quero saber fazer blot igual vc!
- Ao Dieguito, que não contribuiu tão diretamente ao trabalho, mas fez café e trouxe bolo, fazendo a vida no lab a bittersweet, literalmente. MUITÍSSIMO obrigado pela sua grande amizade tbm. Luv u!

À Tammy, miguxa bestie s2 4ever after. Não tenho palavras suficientes para poder dizer o quanto sou grato e o quanto gosto de você (meio clichê isso né). Você é D+ cara. Minha twin soul, minha irmã do s2. Muito obrigado pela amizade incondicional e por praticamente me dar uma segunda família. Me sinto um Iwasa-Arai quase. Volta logo que eu to morrendo de saudades, sua lynda!

Ao Max e à Thais, rommies excepcionais, e demais amigos da graduação (Dani, Arthur, Pablo, Dayse, Bianca, Sabrina, Juliano, Lari, Camila, Rondonia, Julia, Guilherme, Flávia, Camila, ...) muitíssimo obrigado por fazerem minha vida em Floripa tão feliz.

Aos miguxos de Tubarão, Renan, Isabela, Bruna, Guilherme, Murilo, Daiane, Taiane, Cintia, Ana Maria. Grãfinos eternos!

Aos miguxos de Chicago, Felipe, Alvaro, Ricardo, Cesar, Pedro, Bernardo, Priscila, Camila, Ana, Anike, Silvia, Jéssica, Camila, Larissa, Fernando, Gustavo, Renan, Vilson, Natalia e cia ilimitada. Muito obrigado por terem feito de 2012 um ano inesquecível. Vcs são D+. Não posso esquecer da Dani e da besta da Clara. Pittsburgh, é nós!

Aos membros da banca, muitíssimo obrigado pela disposição em avaliar e contribuir com esse trabalho. Ainda ao Prof<sup>o</sup> Giordano, pelo exemplo de dedicação, por sempre estar disposto a me ajudar e pelas milhares de cartas de recomendação. Espero um dia poder retribuir à altura, se é que possível. À Prof<sup>a</sup> Evelise, pelo simpatia, exemplo de profissionalismo e pelas excelentes aulas de desenvolvimento. A única pessoa no mundo que um dia me fez entender como se forma o coração. À Talita, já falei bastante dela. Pega leve comigo durante a defesa, plis!

Ao CNPq e PIBIC, pelo incentivo financeiro e pela bolsa de iniciação científica. À CAPES e ao Programa Ciência sem Fronteiras pela bolsa de intercâmbio no exterior.

E a todos aqueles que não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

A implementação de tecnologias baseadas no uso de células tronco adultas requer a identificação de fontes prontamente disponíveis bem como o estabelecimento de metodologias de cultivo, expansão e diferenciação dessas células. Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização e a expansão *in vitro* de células tronco epidermais da crista neural (EPI-NCSCs). Tais células residem no folículo piloso adulto e são remanescentes da crista neural - estrutura embrionária que origina o sistema nervoso periférico, melanócitos da pele, e musculatura lisa, ossos e cartilagens da região cefálica. Devido à acessibilidade e amplo potencial de diferenciação, as EPI-NCSCs são consideradas candidatas promissoras para futuras aplicações em Medicina Regenerativa e Bioengenharia Tecidual. Usando técnicas de cultivo de células em condição aderente e lançando mão das metodologias de imunofluorescência, RT-PCR, *western blot* e citometria de fluxo, demonstramos nesse trabalho que as EPI-NCSCs isoladas de vibrissas de camundongos adultos são caracterizadas pela expressão de genes característicos da CN (incluindo nestina, p75NTR, Pax3, Slug, Snail, Sox10 e Twist) e podem ser rotineiramente cultivadas e expandidas *in vitro*. Além disso, verificamos que a combinação dos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> no meio de cultivo estimula a proliferação e direciona essas células a um estado de progenitor neuronal às expensas dos fenótipos glial e de músculo liso – o que foi evidenciado, respectivamente, pelo aumento na taxa de incorporação de BrdU e pela aquisição de morfologia semelhante à neuronal aliada a expressão de proteínas neurais. Em última análise, esses resultados evidenciam a possibilidade de obtenção de uma linhagem de células neuronais a partir de um órgão de fácil acesso como a pele, bem como as vantagens do uso dos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> nesse processo. Tal linhagem poderia futuramente servir de base para tratamento de lesões do sistema nervoso, testes de drogas *in vitro*, e outras aplicações biotecnológicas.

**Palavras chave:** células tronco; crista neural; cultivo celular; diferenciação celular.



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso tipo alfa
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CN	Crista neural
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDN-3	Endotelina-3
EDTA	Ácido etilanediamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPI-NCSCs	Células tronco epidermais derivadas da crista neural
FGF <sub>2</sub>	Fator de crescimento de fibroblastos 2
Gap43	Proteína associada a crescimento neuronal 43
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gfap	Proteína fibrilar ácida glial
Ig	Imunoglobulina
MEM	Meio essencial mínimo
MSCs	Células tronco de melanócitos
NGF	Fator de crescimento de nervo
p75NTR	Receptor de neurotrofina p75
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina tamponada fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SKPs	Precursores derivados da pele
TBS	Salina tamponada TRIS



## SUMÁRIO

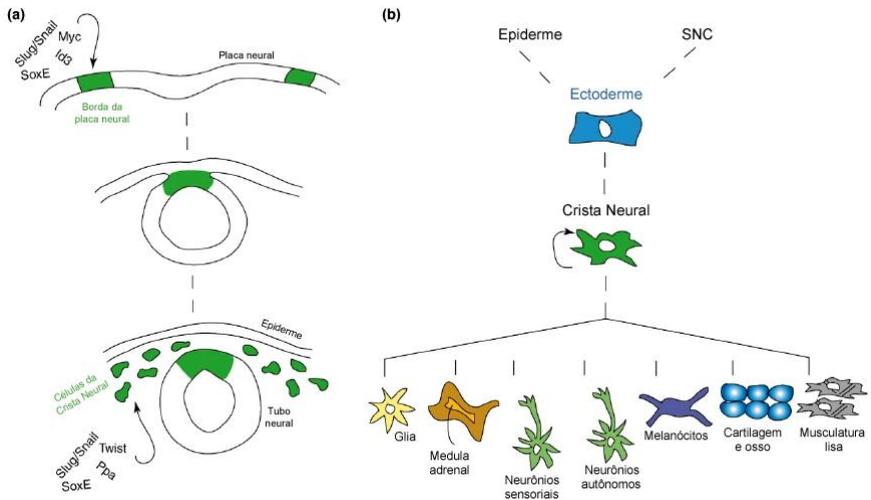
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>255</b>
Crista neural .....	25
Multipotencialidade da crista neural .....	26
Plasticidade da crista neural .....	27
Fontes alternativas de células da crista neural.....	28
Folículo piloso e células tronco derivadas da crista neural .....	31
Células tronco adultas e perspectivas terapêuticas.....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
Objetivo geral.....	35
Objetivos específicos.....	35
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
Animais .....	37
Isolamento de EPI-NCSCs – cultura primária.....	37
Culturas secundárias.....	37
Ensaio de proliferação celular .....	38
Ensaio de diferenciação celular .....	38
RT-PCR.....	38
Imunofluorescência .....	39
Citometria de fluxo.....	41
Western blot .....	41
Análise estatística.....	43
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
Isolamento e caracterização fenotípica de EPI-NCSCs em cultura primária .....	45
Efeito do EGF e FGF <sub>2</sub> sobre a proliferação de EPI-NCSCs.....	48
Efeito do EGF e FGF <sub>2</sub> sobre a expressão de marcadores de indiferenciação .....	50
Efeito do EGF e FGF <sub>2</sub> sobre o potencial mesenquimal .....	52
Efeito do EGF e FGF <sub>2</sub> sobre o potencial de diferenciação neural .....	55
Potencial de diferenciação neuronal de EPI-NCSCs após tratamento com EGF e FGF <sub>2</sub> .....	58
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
EGF e FGF <sub>2</sub> e expressão de marcadores de indiferenciação celular..	63
EGF e FGF <sub>2</sub> e expressão de marcadores de tipos celulares diferenciados .....	65

Uso do EGF e FGF <sub>2</sub> como alternativa para expansão <i>in vitro</i> das EPI-NCSCs .....	66
Efeito do EGF e FGF <sub>2</sub> sobre o potencial de diferenciação neuronal <i>in vitro</i> das EPI-NCSCs .....	68
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## INTRODUÇÃO

### Crista Neural

A crista neural (CN) é uma estrutura embrionária transitória dos vertebrados formada por uma população de células altamente multipotentes originadas das bordas do tubo neural durante o processo de neurulação (Fig.1). Logo após o fechamento do tubo neural, as células da CN passam pelo processo de transição epitélio-mesenquimal, desprendem-se do neuroepitélio de origem e assumem um caráter altamente migratório. Essas células irão migrar por rotas específicas no embrião, originando uma grande diversidade de tipos celulares em diversos órgãos e estruturas do corpo<sup>1</sup>.



**Figura 1 – Processo de formação da crista neural e tipos celulares derivados.** (a) Esquema simplificado dos estágios de formação da CN e fatores regulatórios envolvidos. A CN se forma a partir de duas populações de células (verde) em ambos os lados da placa neural. Com o fechamento do tubo neural, tais células passam a ocupar uma posição dorsal e, logo em seguida, começam a migrar ao longo de todo embrião. Fatores de transcrição como *Slug*, *Snail* e *Sox E* estão envolvidos tanto na formação inicial quanto no comportamento migratório das células da CN. (b) Linhagens celulares derivadas da CN, incluindo células gliais e neurônios do sistema nervoso periférico, células da medula adrenal, melanócitos da pele, osteócitos e condrocitos, e células de músculo liso. Adaptado de Taylor & LaBonne, 2007.

Dependendo da posição de origem ao longo do eixo ântero-posterior do embrião, as células da CN podem ser agrupadas em grandes domínios funcionais: cefálico, cardíaco, vagal, truncal e sacral. Estas diferentes populações seguem caminhos diversos de migração e originam diferentes tipos celulares<sup>3,4</sup>. A região cefálica da CN dá origem a neurônios, células gliais, melanócitos, células musculares lisas, adipócitos e a quase todo tecido conjuntivo e esquelético da crânio, face e pescoço<sup>3,5</sup>. As células da região vagal, juntamente com as células da região sacral, contribuem para a formação do sistema nervoso entérico. Já a CN da região cardíaca contribui para a formação do septo cardíaco, que separa a circulação pulmonar da aorta, bem como dão origem a melanócitos, músculo liso do arco aórtico, e gânglios parassimpáticos cardíacos<sup>3,6</sup>.

A CN truncal, por sua vez, dá origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, bem como células pigmentares da pele. As células oriundas dessa região migram ao longo de duas vias principais no embrião: a primeira, dorso-ventral, dá origem a neurônios sensoriais e simpáticos e células gliais, enquanto na segunda - a rota dorso-lateral, as células se instalam entre a derme e a epiderme, dando origem aos melanócitos da pele<sup>4</sup>.

### **Multipotencialidade da crista neural**

A ampla capacidade de diferenciação da CN se deve a uma heterogeneidade observada nessa população celular. Ao início da fase de migração, a CN consiste de uma população heterogênea de células altamente multipotentes, capazes de originar múltiplos derivados, células progenitoras cujo potencial de diferenciação é mais limitado e células já comprometidas com uma linhagem celular em particular. Além de multipotentes, uma proporção de células que compõem a CN apresentam também a habilidade de se dividir continuamente e dar origem a células filhas inalteradas – processo conhecido como autorrenovação – sendo dessa forma verdadeiras células tronco<sup>7-9</sup>.

Os primeiros experimentos demonstrando a multipotencialidade das células da CN foram realizados *in vitro* a partir de embriões de aves, onde analisou-se o potencial de diferenciação dessas células por meio de ensaios clonais<sup>10</sup>. Nesses experimentos células isoladas da CN deram origem a três tipos de clones: contendo somente melanócitos ou somente neurônios adrenérgicos, e clones contendo ambos.

Alguns anos mais tarde, a multipotencialidade das células da CN truncal foi demonstrada *in vivo* a partir da microinjeção de células da CN marcadas com corantes fluorescentes em embriões. Esses

experimentos demonstraram que pelo menos algumas das células da região truncal poderiam originar múltiplos tipos celulares, incluindo os neurônios sensoriais, glia, melanócitos, e células adrenomedulares<sup>11</sup>. De maneira semelhante, a CN cefálica também origina uma variedade de tipos celulares. Além de neurônios, glia e melanócitos, as células da região cefálica possuem a capacidade de gerar *in vivo* derivados mesenquimais, como cartilagem, osso, tecido conjuntivo e células musculares lisas<sup>12</sup>. A primeira evidência da existência de um precursor multipotente da CN cefálica capaz de originar linhagens neurais e mesectodermis foi obtida por Barroffio e colaboradores<sup>13</sup> através da identificação *in vitro*, em modelo de aves, de um precursor multipotente comum para glia, neurônio, melanócito e cartilagem.

Estudos *in vitro*, a partir de células da CN de aves, feitos por Trentin e colaboradores (2004) demonstraram a existência de outros dois precursores multipotentes: o primeiro originando glia, melanócito, músculo liso e cartilagem, na região cefálica, e o segundo originando glia, neurônio, melanócito e músculo liso – identificado tanto na região cefálica, quanto truncal. Nesse trabalho verificou-se também a capacidade de autorrenovação dos progenitores bipotentes glia-melanócito e glia-músculo liso em ambas as regiões, demonstrando serem verdadeiras células tronco. Calloni e colaboradores, também utilizando abordagens *in vitro*, demonstraram a existência de um precursor altamente multipotente, encontrado predominantemente na região cefálica da CN, capaz de produzir células gliais, neurônios, melanócitos, células de músculo liso, condrócitos e osteócitos<sup>14</sup>.

Mais detalhes e referências a respeito de estudos investigando o potencial de diferenciação de células embrionárias da CN podem ser encontrados nas revisões de literatura publicadas por LeDouarin *et al.* (2008) e Dupin *et al.* (2010).

### **Plasticidade da crista neural**

A plasticidade exibida por células da CN é uma característica retida por alguns tipos celulares diferenciados a qual ela dá origem. Essa idéia de reprogramação fenotípica de derivados da CN é suportada por uma série de experimentos *in vitro* que ilustram a habilidade de melanócitos epidermais e células de Schwann isoladas de nervo periférico em sofrerem recíproca transdiferenciação passando por um estágio de progenitor bipotente glia-melanócito<sup>15,16</sup>

Quando estimuladas a proliferar pelo mitógeno Endotelina3 (END-3) em ensaios clonais *in vitro*, células pigmentares isoladas de embriões de aves se desdiferenciam e ativam genes específicos da

linhagem glial, dando origem a uma progênie composta tanto por células pigmentares quanto gliais<sup>15</sup>. Da mesma forma, a conversão de glia periférica em melanócitos também envolve a produção de uma progênie mista de células gliais e melanocíticas em análises clonais utilizando END-3<sup>16</sup>. Em ambos os casos, as células descendentes apresentam um estado transitório, no qual coexpressam proteínas características da linhagem melanocítica e proteínas características de linhagem glial.

Um trabalho posterior do mesmo grupo de pesquisa demonstrou que células de Schwann isoladas de embriões de aves também são capazes de originar, independentemente do uso de END-3, outro fenótipo derivado da CN – as células de músculo liso<sup>17</sup>. Nesse mesmo trabalho, usando experimentos *in vivo*, verificou-se a mesma habilidade de diferenciação *in vivo* das células gliais em células de músculo liso, os quais são recrutados na formação da musculatura lisa perivascular de vasos sanguíneos em desenvolvimento.

Juntos, esses resultados demonstram que o estado diferenciado de células derivadas da CN não é fixo<sup>5</sup>. Quando submetidos a um novo microambiente ou quando retirados do nicho fisiológico, esses derivados podem reverter seu fenótipo e assumir propriedades de células tronco, similares às dos progenitores multipotentes da CN dos quais se originaram. Tal plasticidade fenotípica sugere que, em alguns tecidos e órgãos adultos, a desdiferenciação de células originadas da CN possa ser um mecanismo eficiente na reposição celular e reparo tecidual após lesões ou condições patológicas<sup>5,18</sup>.

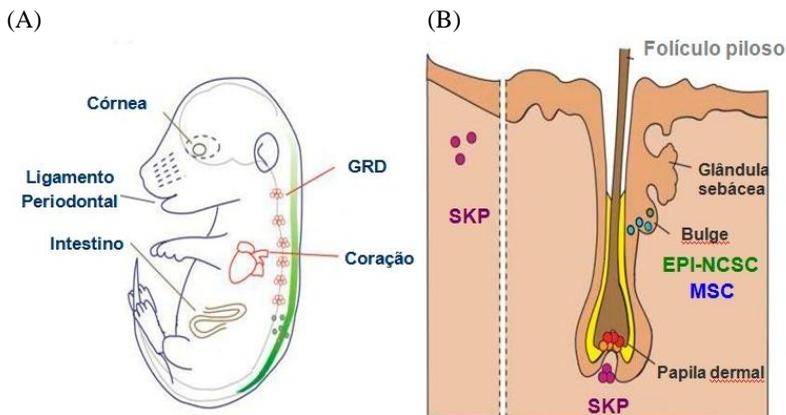
Outra possibilidade levantada graças a esses resultados é que células tronco de origem da CN presentes em tecidos adultos possam ser derivados diferenciados que, em cultura, se desdiferenciam e readquirem multipotencialidade. Embora raramente explorada, essa possibilidade requer maior atenção em trabalhos futuros da área<sup>19</sup>.

### **Fontes alternativas de células da crista neural**

Além dos tipos celulares diferenciados da CN presentes em vários tecidos e órgãos, muitas populações de células tronco e progenitoras da CN têm sido encontradas em fases mais avançadas do desenvolvimento embrionário (fases pós-migratórias da CN) e até mesmo em tecidos adultos<sup>19-21</sup> (Fig.2).

A persistência desses progenitores indiferenciados em órgãos adultos, tais como pele, ligamento periodontal, coração, córnea e gânglios de raiz dorsal, tem sido demonstrada em camundongos transgênicos – entre eles Wnt-LacZ e Wnt1-cre/R26R – nos quais as células originadas da CN podem ser identificadas pela expressão

constitutiva de  $\beta$ -galactosidade<sup>22-27</sup>. Outra abordagem empregada nesses estudos - a qual permite também a identificação de células tronco derivadas da CN em humanos - é a análise da expressão de proteínas consideradas marcadores da CN, ou seja, aquelas que estão envolvidas na regulação dos processos de indução, migração e diferenciação e na multipotencialidade das células embrionárias da CN. Dentre esses marcadores mais utilizados estão os fatores de transcrição Slug, Snail, Twist, Pax3, FoxD3, Sox9 e Sox10, os receptores de membrana p75NTR e HNK-1 e a proteína de filamento intermediário nestina<sup>28</sup>.



**Figura 2 – Células tronco derivadas da crista neural identificadas em tecidos adultos.** (A) Representação esquemática de camundongo neonato e os locais dos quais células tronco derivadas da CN já foram isoladas. (GRD para gânglios de raiz dorsal). (B) Células tronco de origem da CN identificadas na pele. O folículo piloso contém uma diversidade de populações de células tronco, incluindo as células tronco de melanócito (MSCs, em azul), células tronco epidermais da CN (EPI-NCSCs, em verde), células precursoras da pele (SKPs, em violeta) e células não relacionadas com a CN, como células tronco mesenquimais e células tronco de queratinócitos (não mostradas para simplificação). Células precursoras da pele podem estar presentes também em um nicho ainda não bem conhecido da derme. Adaptado de Delfino-Machín *et al.*, 2007<sup>19</sup>.

Quando isolados e cultivados *in vitro* alguns desses progenitores adultos são capazes de se diferenciar em muitos tipos celulares derivados da CN, como neurônios, células gliais, células de músculo liso, melanócitos, osteócitos, adipócitos e condrócitos<sup>5,19,20</sup>.

Entretanto, a função fisiológicas dessas células ainda não é completamente compreendida. Dentre as mais bem caracterizadas funcionalmente estão as células tronco de melanócitos, as quais foram identificadas na porção inferior do bulge do folículo piloso de mamíferos e são responsáveis pela manutenção do sistema de pigmentação dos pelos ao longo de seus ciclos de crescimento<sup>29</sup>. Essas células tronco são desprovidas de grânulos de melanina, apresentam baixa taxa de divisão e são capazes de se autorrenovarem e gerar melanócitos maduros *in vivo*.

Outro exemplo em que o papel fisiológico de progenitores adultos derivados da CN já é bem conhecido são células tronco identificadas na polpa dental, as quais diferenciam-se em odontoblastos e são responsáveis pela reparação da dentina durante a vida adulta. Tais células podem ser expandidas *in vitro* e são capazes de reconstituir dentina em modelos experimentais de transplante, oferecendo, dessa forma, uma alternativa promissora para engenharia tecidual e regeneração dental em um futuro próximo<sup>30-32</sup>. Além da polpa dental, foi demonstrado em nosso grupo de pesquisa que o ligamento periodontal humano também é uma fonte de células com características de CN, as quais são capazes de se diferenciar em derivados mesodermais e neurais<sup>33</sup>.

A pele adulta – ou mais especificamente, o folículo piloso - é outro importante nicho de células tronco adultas de origem da CN. Por ser o órgão de maior acessibilidade no indivíduo adulto, a pele representa uma fonte atrativa de células tronco para transplantes autólogos em medicina regenerativa. Dessa forma, muitos laboratórios tem descrito, de forma independente, o isolamento de células multipotentes com características de CN através de protocolos minimamente invasivos da pele de roedores e humanos. Tais células são capazes de se autorrenovarem e possuem potencial para gerar neurônios, glia, células de músculo liso, condrócitos, adipócitos e melanócitos<sup>22,24,34-41</sup>.

Devido à facilidade de obtenção e amplo potencial de diferenciação, essas células tronco isoladas da pele são atrativas para uma variedade de aplicações terapêuticas. Nesse sentido, alguns trabalhos recentes tem se dedicado a avaliar a capacidade das mesmas em promover reparo tecidual. Em modelos murinos de lesões de sistema nervoso central e periférico, células de origem da CN conhecidas como SKP (do inglês *skin-derived precursors cells*, ou células precursoras derivadas da pele) foram eficientes na reposição local de neurônios e na remielinização de fibras nervosas<sup>42,43</sup>. O

potencial esquelotogênico dessas células foi também explorado em modelo de fratura óssea, onde, após transplantadas, foram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica e contribuir para a reparação óssea<sup>44</sup>.

Assim a pele é vista como uma promissora fonte de células tronco somáticas para futuras terapias regenerativas. Entretanto, ainda é preciso compreender melhor a natureza e a origem dessas células, sendo de extrema importância investigar a relação entre as diferentes populações, bem como identificar marcadores definitivos e o nicho fisiológico das mesmas<sup>19,20</sup>.

### **Folículo piloso e células tronco derivadas da crista neural**

O folículo piloso – uma invaginação da epiderme responsável pela formação e crescimento dos pelos – corresponde a um reservatório relativamente amplo de populações de células tronco adultas (Fig.2), incluindo aquelas envolvidas na homeostase de toda a epiderme, das glândulas sebáceas e da própria estrutura do folículo<sup>45,46</sup>, células tronco mesenquimais<sup>47,48</sup>, e células tronco de origem da CN<sup>22,24,29,36–38,40,41</sup>. Dentre as últimas, estão as chamadas células tronco de melanócitos<sup>29</sup> (ou MSCs, do inglês *melanocyte stem cells*), os precursores derivados da pele<sup>22</sup> (ou SKPs) e também as células tronco epidermais da CN<sup>24</sup> (EPI-NCSCs, de *epidermal neural crest stem cells*), as quais são o foco desse estudo.

Utilizando um sistema de cultivo de explantes, Sieber-Blum e colaboradores descreveram em 2004 a presença de células multipotentes, referidas como células tronco epidermais da CN (EPI-NCSCs), na região do bulge do folículo piloso adulto. Essas células são isoladas em virtude da habilidade migratória que exibem quando cultivadas, e a origem da CN das mesmas foi comprovada em camundongos transgênicos *Wnt1-CRE/R26R*, no qual todas as linhagens descendentes da CN são permanentemente marcadas pela expressão de  $\beta$ -galactosidase<sup>24</sup>.

Diferentemente das MSCs, consideradas unipotentes<sup>29</sup>, as EPI-NCSCs apresentam um amplo potencial de diferenciação, incluindo quase todos os fenótipos derivados da CN. Quando submetidas a análises clonais *in vitro*, EPI-NCSCs dão origem a células expressando marcadores de neurônios, células gliais, células de músculo liso e melanócitos. Adicionalmente, quando diferenciadas na presença da citocina Neurogulina-1, EPI-NCSCs originam precursores de células de Schwann e, na presença de BMP-2, condrócitos<sup>24</sup>

No que diz respeito à expressão de marcadores, EPI-NCSCs tem sido caracterizadas pela expressão de Sox10, um marcador relacionado a manutenção da multipotencialidade de células da CN<sup>28</sup> e pela proteína de filamento intermediário nestina, expressa em progenitores neurais indiferenciados<sup>49</sup>. Utilizando metodologia de análise de expressão em série (LongSAGE), Hu e colaboradores propuseram uma assinatura molecular para EPI-NCSCs, o qual consiste de 19 genes cuja expressão é comum a essas células e às células embrionárias da CN<sup>50</sup>.

Por serem consideradas promissoras para futuras aplicações em medicina regenerativa, trabalhos mais recentes tem focado no isolamento e cultivo de EPI-NCSCs a partir de amostras de pele humana<sup>38,40</sup>. Usando a mesma metodologia proposta por Sieber-Blum e colaboradores em modelo murino, esses dois trabalhos independentes descreveram a obtenção e caracterização de uma população de células que expressam marcadores da CN e marcadores característicos de células tronco embrionárias, como Nanog, Oct-4 e Sox2. Além desses marcadores, verificou-se que o perfil de expressão gênica das células humanas corresponde àquele definido por Hu *et al.* (2006). Por fim, esses trabalhos demonstraram que tais células são capazes de se autorrenovarem *in vivo* e possuem potencial para gerar osteócitos, condrócitos, melanócitos, neurônios, células de músculo liso e células de Schwann.

Por se tratar de células multipotentes em um tecido facilmente acessível, capazes de serem isoladas com um procedimento minimamente invasivo, as EPI-NCSCs são, dessa forma, candidatas atrativas para uma ampla variedade de aplicações em terapia celular. Entretanto, no que diz respeito à pesquisa básica, ainda é preciso entender o seu papel fisiológico e verificar se as características de células tronco desse derivado da CN podem ser adquiridas em cultura via desdiferenciação celular<sup>20</sup>. É de extrema relevância também se desenvolver protocolos mais eficientes para expansão e diferenciação das mesmas em tipos celulares de interesse. A consideração dessas questões certamente irá influenciar o sucesso da implementação de tecnologias que utilizem essas células com propósitos terapêuticos<sup>19</sup>.

### **Células tronco adultas e perspectivas terapêuticas**

A medicina regenerativa e a engenharia tecidual são áreas promissoras e em pleno desenvolvimento na área da saúde. A medicina regenerativa propõe o reparo e/ou substituição de tecidos que sofreram lesão ou degeneração, enquanto a engenharia de tecidos trabalha na

construção de substitutos de tecidos perdidos, procurando associar biomateriais com células - mobilizadas do tecido adjacente para o implante ou introduzidas com este - em busca da integração permanente da nova estrutura ao tecido restaurado. O recente conceito do uso terapêutico de células tronco traz uma nova perspectiva: essas células, devido ao amplo potencial de regeneração e capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, permitiriam potencialmente recriar tecidos e repetir a sua geração, o que normalmente só ocorre durante a embriogênese<sup>51</sup>.

A utilização de células tronco adultas é ainda mais promissora nessas áreas. Isso se deve principalmente ao fato de que vários tecidos adultos contêm reservas de células tronco, o que possibilita transplantes autólogos, evitando-se, conseqüentemente, problemas de rejeição imunológica e a espera por doadores compatíveis. Além disso, o uso de células tronco adultas levanta menos controvérsias em relação a questões éticas e religiosas, principalmente no que diz respeito à utilização de blastocistos humanos. Outra aplicação bastante promissora de células tronco adultas é na indústria farmacêutica. Tais células podem ser utilizadas em testes de drogas *in vitro* tanto para se testar a eficiência quanto a segurança de novos medicamentos<sup>52</sup>.

Entretanto, a implementação de tecnologias baseadas no uso de células tronco adultas com propósitos terapêuticos requer a realização de pesquisa básica. Dentre as etapas cruciais, estão a identificação de fontes acessíveis de células tronco em tecidos adultos e o desenvolvimento de metodologias para cultivo e propagação que permitam a manutenção da multipotencialidade e da capacidade de autorrenovação dessas células. Além disso, a identificação de marcadores moleculares associados à multipotencialidade e de fatores de crescimento que promovam a proliferação, a sobrevivência ou a diferenciação dessas células em linhagem celular de interesse são passos importantes que irão facilitar o desenvolvimento de processos clínicos baseados em células tronco<sup>53</sup>.

Dentro das estratégias adotadas em pesquisa básica com células tronco, nosso trabalho tem como objetivo avaliar e caracterizar o folículo piloso de camundongos como fonte acessível das células tronco conhecidas como EPI-NCSCs. Para isso buscamos investigar a expressão de marcadores associados ao estado indiferenciado e multipotente de células da CN, bem como analisar a influência de fatores de crescimento como uma possível alternativa para expansão *in vitro* dessas células. O trabalho é de grande relevância, uma vez que

pode fornecer informações necessárias para o delineamento de aplicações em medicina regenerativa e bioengenharia tecidual utilizando-se EPI-NCSCs. Tais células podem, futuramente, servir de base para geração de linhagens possíveis de serem utilizadas em testes de drogas *in vitro* ou no tratamento de lesões do sistema nervoso, doenças desmielinizantes, problemas vasculares, degenerações ósseo-cartilaginosa, entre outras.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

- Avaliar *in vitro* os efeitos dos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> sobre o potencial de diferenciação e capacidade de proliferação de células tronco epidermais derivadas da crista neural (EPI-NCSCs) obtidas de camundongos adultos.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar as EPI-NCSCs obtidas em culturas primárias através de análises imunofenotípicas e de expressão de genes relacionados à crista neural e células tronco residentes no folículo piloso.
- Avaliar o efeito do tratamento com os fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a capacidade de proliferação das EPI-NCSCs, visando a expansão e a manutenção *in vitro* das mesmas.
- Avaliar os efeitos do tratamento com os fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a morfologia e o potencial de diferenciação mesenquimal, glial e neuronal das EPI-NCSCs.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Animais**

Foram utilizados camundongos adultos da linhagem C57BL/6, com idade entre oito e doze semanas, obtidos no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os procedimentos descritos no trabalho estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o protocolo número PP810/CEUA.

### **Isolamento de EPI\_NCSCs – cultura primária**

O procedimento utilizado para o isolamento das células tem como base o protocolo descrito por Sierber-Blum e colaboradores<sup>24,54</sup>. Os animais foram sacrificados e a pele em torno das vibrissas removida. Sob observação em microscópio estereoscópico, os folículos pilosos foram individualizados e a cápsula de colágeno que os reveste retirada. Subsequentemente, foi realizada uma transecção acima e abaixo da região do bulge. As porções do bulge foram então colocados em placas de cultura 35 mm previamente revestidas com Colágeno I e pré-incubados por 10 horas para adesão ao substrato. Em seguida, adicionou-se 1,5 ml de meio de cultura, o qual consistiu de alfa MEM acrescido de 15% de soro fetal bovino, sendo este renovado a cada três dias. A partir do quinto dia, células começam a emigrar dos explantes e, no décimo quarto, esses foram removidos e as células aderidas analisadas por RT-PCR, citometria de fluxo e Imunofluorescência, conforme descrito a seguir. Tanto a pré-incubação do explantes quanto o cultivo das células foram realizados sob condições padrões – 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>.

### **Culturas secundárias**

Para realização das culturas secundárias, os explantes de folículo piloso foram removidos após 14 dias de cultivo, e as células remanescentes descoladas da placa com solução tripsina-EDTA (Sigma). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (1200 rpm por 5 minutos) e replaqueadas a uma densidade de 500 células por poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno I. Os meios foram compostos de alfa MEM acrescido de 15% de soro fetal bovino (condição controle) e o mesmo meio suplementado com EGF e FGF<sub>2</sub> (referido com EGF + FGF<sub>2</sub>) nas concentrações de 20 e 40 ng.mL<sup>-1</sup>,

respectivamente. As culturas foram mantidas por mais sete dias, a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>, com renovação do meio de cultivo a cada três dias. Após o período, seguiram-se os ensaios de diferenciação e proliferação celular ou as análises por RT-PCR, Imunofluorescência, Citometria de fluxo ou *Western blot*, conforme descrito a seguir.

Para o cultivo a longo prazo as células obtidas em cultura primária foram tripsinizadas e replaqueadas em garrafas de cultura revestidas com colágeno I a uma densidade de 2000/cm<sup>2</sup> em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. As culturas foram repicadas a cada 10 dias e mantidas até a sexta passagem. Após esse o período as células foram congeladas em solução 10% de DMSO em soro fetal bovino e mantidas a -196°C no banco células do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **Ensaio de proliferação celular**

A taxa de proliferação celular foi analisada pela incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um composto análogo ao nucleotídeo timidina que, quando acrescido ao meio de cultura, é incorporado pelas células em processo de divisão. As culturas foram incubadas com BrdU (Zymed, 1:100) por 4 horas, sendo a seguir fixadas com paraformaldeído 4%, enxaguadas com água destilada e incubadas em ácido clorídrico 2N por 30 minutos a 37°C. Após esses procedimentos, as células foram submetidas à análise de imunofluorescência usando anticorpo anti-BrdU, conforme descrito a seguir.

### **Ensaios de diferenciação celular**

Para diferenciação no fenótipo neuronal, os meios de cultivo controle e EGF + FGF2 foram removidos no sétimo dia de cultura secundária e substituídos por meio indutivo, o qual consistiu de meio neurobasal suplementado com B27 (1x), BDNF (10 ng.ml<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (200 μM), NGF (10 ng.ml<sup>-1</sup>), e cAMP (0.1 mM), conforme descrito em Liu *et al.* (2012). As culturas foram mantidas por 14 dias em condições padrões de cultivo com o meio renovados a cada 3 dias. Após o período de indução, as culturas foram fixadas e imunomarcadas, conforme descrito a seguir.

### **RT-PCR**

Para as análises de expressão gênica, amostras de RNA total foram extraídas das células em cultivo utilizando-se reagente Trizol (Invitrogen). As amostras foram, então, tratadas com DNase RQ1

(Promega) para remover possíveis contaminações com DNA genômico. Ambos os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações dos fabricantes. A partir do RNA isolado, moléculas de cDNA foram sintetizadas por meio de reação de transcrição reversa utilizando o kit ImProM-II Reverse Transcription System (Promega). Os cDNAs dos genes *Foxd3*, *Gapdh*, *Pax3*, *Slug*, *Snail*, *Sox9*, *Sox10* e *Twist*, foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando reagente GoTaq Master Mix (Promega), 0,4 nM de iniciadores, e 1 µl de cDNA, em um volume final de 25 µl. As reações consistiram de 45 ciclos repetidos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos (temperatura dependente do par de iniciadores) e extensão a 72°C por 60 segundos. A tabela 2 a seguir apresenta os pares de iniciadores utilizados para cada transcrito gênico, suas respectivas temperaturas de anelamento e tamanho do fragmento amplificado.

Para análises quantitativas foram realizadas reações de PCR real time, método SYBR Green, conforme instruções do fabricante. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram determinados de maneira relativa a expressão gene *Gapdh*, conforme o método Pfaffl<sup>56</sup>. Todas as análises foram conduzidas em triplicata e utilizaram RNA isolado do tubo neural de embrião murino E12 como controle positivo das reações.

Para as análises qualitativas, os produtos das reações foram corados com o reagente Blue Green Load Dye (LGC Biotechnologies) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, para posterior visualização em luz ultravioleta. Já nas reações de PCR real time, os produtos foram checados através de curva de denaturação.

### **Imunofluorescência**

Para as análises de expressão protéica as culturas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, enxaguadas três vezes com tampão PBS, permeabilizadas com solução Triton X-100 0,5% por 20 minutos, e em seguida incubadas com solução de soro fetal bovino 5% durante 1 hora para inativação de sítios inespecíficos. As culturas foram então incubadas com anticorpos primários por período de 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente, sob às mesmas condições, com anticorpos secundários conjugados ao fluorocromo Alexa488 ou Alexa594. As células foram novamente enxaguadas com PBS e incubadas durante 2 minutos com corante fluorescente DAPI para marcação nuclear. Todas as marcações foram observadas, analisadas e

documentadas sob microscópio epifluorescente Olympus IX71. Os anticorpos primários e secundários utilizados são listados na tabela 1.

**Tabela 1** – Listagem dos anticorpos e respectivas diluições utilizadas nas análises de Imunofluorescência (IF), citometria de fluxo (FACS) e *westernblot* (WB).

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Uso
Anti BrdU (IgG1 camundongo monoclonal)	1:500	Promega	IF
anti Fibronectina (IgG coelho policlonal)	1:500	Dako	IF
Anti GAP43 (IgG coelho policlonal)	1:200	Abcam	IF
Anti GFAP (IgG coelho policlonal)	1:200/1:1000	Sigma	IF/WB
Anti Mtf (IgG coelho policlonal)	1:100	Abcam	IF
anti Nesfina (IgG coelho policlonal)	1:100	Abcam	IF
Anti Neurofilamento (IgG coelho policlonal)	1:200	Sigma	IF
Anti p75NTR (IgG coelho policlonal)	1:200/1:1000	Millipore	IF/WB
Anti Pax3 (IgG coelho policlonal)	1:100	Abcam	IF
Anti Sox10 (IgG coelho policlonal)	1:1000	Abcam	IF
Anti $\alpha$ -SMA (IgG2a camundongo monoclonal)	1:800	Sigma	IF/WB
Anti $\beta$ -actina (IgG coelho monoclonal)	1:2000		WB
Anti $\beta$ -tubulina III (IgG1 camundongo monoclonal)	1:500/1:1000	Promega	IF/WB
Anti CD34 – conjugado a PE	1:20	BD	FACS
Anti CD45 – conjugado a PerCP	1:20	BD	FACS
Anti CD73 – conjugado a PE	1:20	BD	FACS
Anti CD90 – conjugado a FITC	1:20	BD	FACS
Anti CD105 – conjugado a PerCP	1:20	BD	FACS
Anti IgG camundongo – conjugado a Alexa 488®	1:500	Invitrogen	IF
Anti igG camundongo – conjugado a Alexa 594®	1:500	Invitrogen	IF
Anti IgG coelho – conjugado a Alexa 488®	1:500	Invitrogen	IF
Anti IgG camundongo – conjugado a Peroxidase	1:2500	Millipore	WB

### **Citometria de fluxo**

Para as análises de citometria de fluxo, as EPI-NCSCs foram tripsinizadas (conforme descrito acima) e ressuspensas em PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino a uma concentração de  $10^5$  células/100 $\mu$ L. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos específicos, durante 1 hora a 4°C.

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 100 $\mu$ L da mesma solução e posteriormente analisadas em citometro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience). Os dados foram gerados pelo software FACS Diva 6.0® e analisados pelo software FlowJo®.

Como controle positivos dos anticorpos utilizou-se tanto uma linhagem de células tronco mesenquimais humanas isoladas de tecido adiposo - as quais são positivas para os marcadores CD73, CD90 e CD105 - quanto leucócitos isolados de sangue periférico, os quais abrangem uma população de células CD34 e CD45 positivas. Os anticorpos utilizados nas análises são listados na tabela 1.

### **Western blot**

Os ensaios foram realizados conforme descrito em Posser *et al.*, 2007. Resumidamente, as células foram mecanicamente lisadas em 100  $\mu$ l de *SDS stopping solution* (4% SDS, 2 mM EDTA, 8%  $\beta$ -mercaptoetanol e 50 mM Tris, pH 6,8). Os lisados foram então aquecidos a 100° C por 5 minutos e centrifugados (10.000 g por 10 minutos a 4° C) para eliminar os restos celulares. Em seguida, adicionou-se nas amostras tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris e azul de bromofenol, ph 6,8) numa proporção de 25:100 (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol a uma concentração final de 8%.

As proteínas (50  $\mu$ g) foram isoladas através de SDS-PAGE em gel de separação de acrilamida 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante 2 h. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose usando sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S. As membranas foram em seguida bloqueadas com 5% de albumina bovina (BSA) em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 hora e, após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5), incubadas *overnight* a

4°C com os anticorpos específicos. Os anticorpos e diluições utilizadas são listados na tabela 1.

Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e reveladas em filme autoradiográfico após adição do substrato quimioluminescente LumiGLO (KPL). O nível de expressão proteica foi determinado pela razão entre a densitometria óptica da banda da proteína de interesse e a banda de  $\beta$ -actina. A densitometria óptica das mesmas foi determinada utilizando-se o software Scion Image ®.

**Tabela 2** – Listagem dos pares de iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica por RT-PCR.

Gene	Sequência dos iniciadores	Temperatura Anelamento	Tamanho do produto
FoxD3	5'-CGACGACGGGCTGGAGGAGGAGAA-3' 5'- ATGAGCGGATGTAAGGGTAG-3'	58°C	326 pb
Gapdh	5'-ATGAGGTCCACCACCCCTGTT-3' 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'	58°C	441 pb
Pax 3	5'-CACCGTCCACAGACCTCAGC-3' CCGATGGTGGGGTTCATGGG-3'	5'- 56°C	177 pb
Shug	5'-CTCTCGGGAGCATACAGC-3' TGAAGTGTCAGAGGAAGGCGGG-3'	5'- 58°C	146 pb
Sra11	5'-ACCCCGCGGGAAGCCAACT AGCGCGGGGTTGAGGACCTC-3'	5'- 64°C	127 pb
Sox9	5'-CTCGGAACTGCCTGGAACTTCT-3' 5'-GGCCACTTGCACTCGTCTCT-3'	54°C	94 pb
Sox10	5'-TTTGGTGGTGAGGATTCAGGCT-3' 5'-GAGGAAGTGGAAAAACCGTGTC-3'	54°C	145 pb
Twist	5'-ACAGGCCCGTGGACAGAGAT-3' TCGTCAAAAAGTGGGGTGGGG-3'	5'- 58°C	112 pb

\*pb = pares de base

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A significância das diferenças entre as médias dos grupos tratado e controle foi avaliada pelo teste t de Student. Utilizou-se ANOVA de duas vias para avaliar a influência de duas variáveis – no caso, tratamento e número da passagem. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 4.0<sup>®</sup>.



## RESULTADOS

### Isolamento e caracterização fenotípica de EPI-NCSCs em cultura primária

Conforme descrito em Materiais e Métodos, os explantes do folículo piloso de vibrissas de camundongos aderiram ao substrato de colágeno I. Em 5-7 dias células com morfologia bipolar ou estrelada começaram a emigrar do explante (Fig. 3a). Em torno de 60-70% dos explantes apresentaram emigração de células e uma média de  $10^3$  células por explante foi obtida no décimo quarto dia de cultura primária.

**Figura 3 – Caracterização morfológica e imunofenotípica de EPI-NCSCs.** (A) Fotomicrografia de contraste de fase mostrando um explante do bulge e células migratórias aderidas ao substrato de colágeno no décimo dia de cultura. À direita, destacando a morfologia característica das células, maior magnitude da área demarcada na imagem à esquerda. (B) Fotomicrografia de fluorescência de células imunomarcadas para Nestina, S0x10, p75NTR e Fibronectina.

A fim de investigar o estado indiferenciado e multipotente das EPI-NCSCs, optamos por avaliar a expressão dos genes associados às células tronco embrionárias da crista neural. As análises de expressão gênica por RT-PCR (Fig.4) revelaram que essas células expressam os mRNAs que codificam os fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Twist, Sox9 e Sox10, os quais são expressos em várias populações de células da crista neural *in vivo*<sup>2,58</sup>. A expressão do mRNA de Foxd3, um marcador de certas subpopulações de células da CN, não foi detectada.

**Figura 4 – Análises de expressão gênica em EPI-NCSCs.** RT-PCR de genes envolvidos na determinação e migração das células embrionárias da crista neural revelou que EPI-NCSCs expressam os mRNAs que codificam para os fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Twist, Sox9 e Sox10. Como controle positivo das reações utilizou-se RNA obtido de tubo neural de embrião murino E12. Gapdh funcionou como controle interno das reações de transcrição reversa.

A nível proteico (Fig. 3b), verificamos a expressão do fator de transcrição Sox10 e do receptor de membrana p75NTR, ambos considerados pela literatura pertinente como marcadores de células tronco e progenitoras da CN<sup>20,59-61</sup>. Observamos também a expressão da proteína de filamento intermediário nestina, marcador de células tronco neurais e células indiferenciadas da CN<sup>20,62,63</sup> - e fibronectina, componente de matriz extracelular expresso caracteristicamente por células precursoras da derme (SKPs)<sup>27,64</sup>.

Análises quantitativas demonstraram que 95-100% das células são positivas para nestina, enquanto apenas aproximadamente 50 e 15% são imunorreativas para Sox10 e p75NTR, respectivamente.

Em conjunto esses resultados demonstraram que a metodologia aqui empregada está de acordo com a literatura e foi eficaz para o isolamento de células indiferenciadas com características da CN a partir do folículo piloso de camundongos. Uma vez que essa estrutura também têm sido descrita como um reservatório de células tronco mesenquimais e células tronco de queratinócitos, avaliamos em seguida a expressão de marcadores de superfície característicos dessas populações celulares. Análises por citometria de fluxo demonstraram que a grande maioria das células obtidas em cultura primária (aproximadamente 99%) não expressa os marcadores de células tronco mesenquimais<sup>65</sup> CD73, CD90 e CD105 e nem CD34, característico de células tronco de queratinócitos<sup>66,67</sup>. A expressão de CD45, marcador de células tronco hematopoiéticas também não foi detectada<sup>68</sup> (Fig.5).

**Figura 5 – Expressão de marcadores de superfície celular característicos de células tronco mesenquimais e células tronco de queratinócitos.** Representação em histogramas de uma amostra submetida à citometria de fluxo para análise os marcadores de superfície celular CD73, CD90, CD105, CD34 ou CD45. A porção cinza do gráfico mostra a autofluorescência das células (não incubadas com os anticorpos) e em preto as amostras incubadas com os anticorpos conjugados a fluorocromos específicos. Tais resultados demonstram que apenas uma pequena porcentagem das EPI-NCSCs obtidas em cultura primária (aproximadamente 1%) expressa os marcadores CD73, CD90, CD105, CD34 ou CD45. N=2.

## Efeito do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a proliferação de EPI-NCSCs

EGF (*epidermal growth factor*) e FGF<sub>2</sub> (*fibroblast growth factor 2*) são fatores de crescimento capazes de estimular a proliferação e a manutenção da plasticidade celular em vários tipos celulares, representando assim uma alternativa para a expansão *in vitro* das EPI-NCSCs<sup>8,69-71</sup>

Os ensaios por incorporação de BrdU realizados após 7 dias de cultura secundária revelaram um aumento significativo da proliferação celular nas culturas secundárias mantidas em 20ng.ml<sup>-1</sup> de EGF e 40ng.ml<sup>-1</sup> de FGF2 quando comparado à condição controle (Fig.6). A taxa de proliferação celular nas células cultivadas na presença dos fatores de crescimento é cerca de duas vezes superior à observada na condição controle.

**Figura 6 – Ensaio de proliferação celular nas culturas secundárias através de incorporação de BrdU.** Núcleos marcados em verde correspondem às células BrdU positivas (em processo de divisão celular) enquanto os núcleos totais foram corados com DAPI, em azul. Aumento de 200x. Os resultados são expressos como proporção de células BrdU positivas em relação ao número total de células. Os valores representam as médias ± erro padrão de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. \* p < 0,05 por teste t de Student.

Para verificar a possibilidade de geração de uma linhagem celular, as células obtidas em cultura primária foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 2000 células/cm<sup>2</sup> em garrafas de cultura revestidas com colágeno I. As culturas foram repicadas a cada 10 dias e mantidas por até 5 passagens. A cada passagem o número total de células em ambas as condições foi contado utilizando-se uma câmara de Neubauer.

Os resultados (Fig.7a) demonstram uma manutenção da capacidade proliferativa ao longo das 5 passagens em ambas as condições analisadas, uma vez que não houve diferenças significativas no número de células obtidas ao fim de cada passagem ( $p > 0,05$  pelo teste ANOVA de duas vias). Verificou-se entretanto, um aumento no número de células nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> em relação à condição controle. O número de células obtidas foi significativamente maior nas culturas tratadas do que nas não-tratadas em todas as passagens analisadas ( $p < 0,05$  pelo teste ANOVA de duas vias).

**Figura 7 – Manutenção de EPI-NCSCs em culturas secundárias.** (A) A cada passagem o número de células foi contado e os resultados plotados no gráfico. Não houve diferenças significativas no número de células obtidas em cada condição ao longo das 5 passagens analisadas. \* para  $p < 0,05$  e \*\* para  $p < 0,01$  por ANOVA de duas vias. (B) Fotomicrografias de contraste de fase de culturas em P5 destacando a morfologia das células sete dias após replaqueamento. Aumento de 40x.

Em seguida, verificamos que o tratamento com os fatores de crescimento afeta também a morfologia celular (Fig.7b). As culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> são morfologicamente homogêneas, com grande maioria das células apresentando formato triangular e prolongamentos citoplasmáticos. Já na condição controle estão presentes células com formato fibroblastóide e células com citoplasma amplo e achatado.

### **Efeito do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão de marcadores de células indiferenciadas**

A fim de verificar se o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> influencia a diferenciação das EPI-NCSCs, analisamos a expressão de fatores de transcrição relacionados ao estado indiferenciado de células s da CN (Fig.8a).

**Figura 8- Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão de genes envolvidos na determinação e migração das células embrionárias da CN em culturas secundárias.** (A) Quantificação relativa pela técnica de RT-qPCR da expressão dos mRNAs Pax3, Slug, Snail, Sox9, Sox10 e Twist nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> em comparação à condição controle (representado pela linha pontilhada no gráfico). Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de referência Gapdh. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas. (B) Ct médio da expressão de Gapdh, utilizando-se 25 ng de cDNA, obtido para cada uma das amostras usadas nos experimentos de RT-qPCR.

Já pela técnica de imunofluorescência, analisamos os efeitos do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão das proteínas nestina e p75NTR (Fig.9). Análises quantitativas demonstraram não haver diferença significativa na proporção de células imunorreativas para esses marcadores entre as duas condições testadas. A porcentagem de células nestina- e p75NTR-positivas, assim como nas culturas primárias, é em torno de 95 e 10%, respectivamente, em ambas as condições.

**Figura 9- Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão dos marcadores proteicos nestina e p75NTR em culturas secundárias.** (A) Análises por imunofluorescência revelaram alterações morfológicas nas células nestina-positivas e p75NTR-positivas nas culturas tratadas com os fatores de crescimento. Não houve diferenças significativas na proporção de células imunorreativas para tais marcadores entre as condições controle e tratado, entretanto.

Observou-se, entretanto, alterações morfológicas significativas nas células nestina-positivas e p75NTR-positivas nas culturas tratadas com os fatores de crescimento (Fig.9). Tais células apresentam volume citoplasmático reduzido e grandes prolongamentos celulares, os quais não são evidentes na condição controle (Fig.9). Conforme demonstrado pelos resultados de *western blot*, não houve diferenças significativas nos níveis de expressão de p75NTR entre a condição controle e o tratamento com os fatores EGF e FGF<sub>2</sub> (Fig.10). Os resultados da quantificação dos níveis de nestina obtidos pela mesma técnica foram inconclusivos. Mesmo utilizando diferentes anticorpos e a diferentes concentrações de

uso, não obtivemos uma banda específica entre 200-220 KDa (peso molecular aproximado da nestina) que pudesse ser referida à essa proteína (resultado não apresentado).

**Figura 10 – Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre os níveis de expressão de p75NTR e nestina.** Quantificação proteica por *western blot* revelou que o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> não altera os níveis de expressão de p75NTR.

### **Efeito do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a potencial mesenquimal das EPI-NCSCs**

A fim de avaliar se o tratamento com os fatores de crescimento é capaz de selecionar células com características mesenquimais ou, alternativamente, induzir EPI-NCSCs a um fenótipo mesenquimal, avaliamos primeiramente a expressão dos marcadores de células tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105.

As análises por citometria de fluxo (Fig.11) mostraram que as células em cultura secundária, tanto na condição controle quanto na presença de EGF e FGF<sub>2</sub>, mantêm um perfil de expressão desses marcadores muito semelhante ao observado nas culturas primárias, sendo aproximadamente 99% das células negativas (Fig.11). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as condições controle e EGF + FGF<sub>2</sub>, ou entre essas e as células em cultura primária.

**Figura 11 – Expressão de marcadores de superfície celular de células tronco mesenquimais em culturas secundárias mantidas em EGF e FGF<sub>2</sub>.** Dados de um experimento representativo no qual células obtidas em cultura secundária foram submetidas à citometria de fluxo para análise os marcadores de superfície celular CD73, CD90, CD105. A porção cinza do gráfico mostra a autofluorescência das células (não incubadas com os anticorpos) e em preto as amostras incubadas com os anticorpos conjugados a fluorocromos específicos. Apenas uma pequena porcentagem de células, tanto na condição controle quanto no tratamento com os fatores de crescimento, expressa os marcadores CD73, CD90, CD105, CD34 ou CD45. N=3.

Em seguida investigamos a expressão da proteína  $\alpha$ SMA (*alpha smooth muscle actin*, inglês para actina de músculo liso tipo alfa), considerada marcadora de linhagem mesenquimal<sup>72-74</sup>. Análise visual das culturas após a imunomarcção demonstrou que aproximadamente 100% das células são reativas para  $\alpha$ SMA em ambas as condições, controle e EGF + FGF (Fig.12a). Entretanto, diferenças significativas na morfologia e nos níveis de expressão dessa proteína foram observadas (Fig.12a-b). Na condição controle, as células são homogêneas quanto à morfologia e apresentam citoplasma amplo e fibras de estresse formadas por  $\alpha$ SMA (Fig.12b”). Já nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>, em torno de 50% das células  $\alpha$ SMA-positivas perdem a morfologia tipicamente mesenquimal e passam a exibir um citoplasma mais reduzido e sem evidente formação de fibras de estresse (Fig.12b”). A quantificação dos níveis de proteína por *western blot* confirmou uma diminuição de aproximadamente 8% (p=0,024 pelo teste t) na expressão de  $\alpha$ SMA nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> (Fig.12c).

**Figura 12- Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão do marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA.** (A) Análises por imunofluorescência revelaram que virtualmente 100% das células são  $\alpha$ -SMA-positivas. Entretanto, verificou-se diferenças morfológicas entre as duas condições analisadas. Na condição controle todas as células apresentam morfologia típica de miofibroblasto, com citoplasma amplo e fibras de estresse bem organizada, como mostrado em (B'). Já na condição EGF + FGF a maioria das células apresentam a morfologia mostrada em (B''), com volume citoplasmático menor e fibras de estresse não evidentes. (C) Quantificação proteica por *western blot* revelou diminuição de 7,53% na expressão de  $\alpha$ -SMA nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>. \* para  $p < 0,05$  por teste t de *Student*.

### **Efeito do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre o potencial de diferenciação neural das EPI-NCSCs**

Tendo em vista dados da literatura que demonstram o papel do EGF e FGF<sub>2</sub> no estabelecimento e manutenção de linhagens de precursores neurais a partir de populações de células tronco embrionárias e adultas, avaliamos em seguida o efeito desses fatores de crescimento sobre a expressão dos marcadores neurais  $\beta$ -tubulina III e GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*).

Análises de imunofluorescência mostraram que, apesar das diferenças morfológicas observadas, 100% das células são imunorreativas para o marcador glial GFAP em ambas as condições experimentais (Fig.13a). Análises complementares por *western blot* revelaram, entretanto, uma diminuição de aproximadamente 22% ( $p=0,011$  pelo teste t) nos níveis de expressão da proteína nas células tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> (Fig.13b).

**Figura 13- Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão do marcador glial GFAP.** (A) Análises por imunofluorescência revelaram que virtualmente 100% das células são GFAP-positivas em ambas as condições analisadas. (B) Análises de *western blot* revelaram uma diminuição de 21,93% na expressão da proteína nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>. \* para  $p < 0,05$  por teste t de *Student*.

Em seguida investigamos por imunofluorescência a expressão de  $\beta$ -tubulina III, proteína de microtúbulo característico de células neuronais. Tais análises demonstraram que a proporção de células que expressam a proteína não difere significativamente entre a condição controle e o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub>. Entretanto, verificou-se um

aumento significativo na proporção de células  $\beta$ -tubulina III-positivas que apresentam características morfológicas semelhantes às de neurônios, i.e., células afiladas com citoplasma reduzido e longos prolongamentos (Fig.14a-b). Consistentemente a esses resultados, as análises de *western blot* revelaram um aumento de aproximadamente 10% na expressão de  $\beta$ -tubulina III nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> em relação à condição controle (Fig.14c).

**Figura 14- Efeito do tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> sobre a expressão do marcador neuronal  $\beta$ -tubulina III.** (A-B) Análises por imunofluorescência revelaram que, embora virtualmente 100% das células sejam imunorreativas para  $\beta$ -tubulina III em ambas as condições, as células mantidas na presença dos fatores de crescimento apresentam características morfológicas semelhantes a de neurônios. (C) Quantificação proteica por *western blot* revelou uma aumento de 10,85% na expressão  $\beta$ -tubulina III nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>. \* para  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para melhor analisar a identidade das células  $\beta$ -tubulinaIII-positivas presentes em nossas condições experimentais, resolvemos investigar a co-expressão do marcador neuronal com os marcadores de precursores neuronais nestina e p75NTR (Fig.15-16).

As análises de imunofluorescência demonstraram que todas as células  $\beta$ -tubulinaIII-positivas são também imunorreativas para nestina (Fig.15) e que, nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>, tais células apresentam a morfologia semelhante a de neurônios, o que não ocorre na condição controle. Adicionalmente, verificou-se que todas as células p75NTR-positivas, tanto na condição controle quanto tratado, co-expressam  $\beta$ -tubulinaIII (Fig.16). Desse modo, levando em consideração a morfologia celular e o padrão de expressão dos marcadores  $\beta$ -tubulinaIII, nestina e p75NTR, nossos resultados sugerem que as células  $\beta$ -tubulinaIII-positivas obtidas nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> correspondem a precursores neuronais em estágio precoce de diferenciação celular.

**Figura 15 – Co-expressão de  $\beta$ -tubulinaIII e nestina em EPI-NCSCs mantidas em cultura secundária.** Fotomicrografias de fluorescência destacando a morfologia das células  $\beta$ -tubulinaIII / nestina – positivas na condição controle e nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>. Aumento de 400x.

**Figura 16 – Co-expressão de  $\beta$ -tubulinaIII e p75NTR em EPI-NCSCs mantidas em cultura secundária.** Fotomicrografias de fluorescência destacando a morfologia das células p75NTR /  $\beta$ -tubulina III – positivas na condição controle e nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>. Aumento de 400x.

### **Potencial de diferenciação neuronal de EPI-NCSCs após tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub>.**

Tendo nossos resultados sugerido que o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> leva ao comprometimento das EPI-NCSCs com a linhagem neuronal, resolvemos investigar em seguida o efeito de um pós-tratamento com meio indutivo neuronal no potencial de diferenciação neuronal das EPI-NCSCs. Para tanto, as culturas foram inicialmente tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> por sete dias (da mesma forma como nos experimentos descritos anteriormente) e, em seguida, induzidas à diferenciação neuronal utilizando meio de cultivo específico.

Após 14 dias de indução, análises de imunofluorescência revelaram um aumento significativo da expressão de Mash1 – fator de transcrição do tipo bHLH que promove o comprometimento e diferenciação neuronal de precursores multipotentes no sistema nervoso central e periférico<sup>75-77</sup> – nas culturas tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub> e pós-tratadas com meio indutivo neuronal. A porcentagem de células Mash1-positivas observada na condição controle foi de  $22,4 \pm 2,1\%$ , enquanto no tratamento foi de  $80,8 \pm 4,1\%$ , representando um aumento de

aproximadamente 4 vezes (Fig.17a). Inesperadamente, observou-se a presença desse fator de transcrição no citoplasma de algumas células em ambas as condições (Fig.17a’’).

**Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> no potencial neuronal das EPI-NCSCs.** (A) Análises de imunofluorescência revelaram aumento na expressão de Mash-1 nas culturas pré-tratadas em com EGF e FGF<sub>2</sub>. \*\* para  $p < 0,01$  por teste t. Na maioria das células imunorreativas a presença de Mash-1 foi restrita ao núcleo (A’). Algumas células apresentaram também localização citoplasmática do fator de transcrição (A’’). Verificou-se que virtualmente 100% das células expressam os marcadores neuronais Neurofilamento (B) e  $\beta$ -tubulina III (C). Entretanto, a expressão de tais proteínas não foi associada a uma morfologia de neurônios maduros, como mostrado em (B’) e (C’). Apenas uma menor proporção das células imunomarcadas apresentaram volume citoplasmático reduzido morfologia bipolar (B’’ e C’’).

Em seguida, investigamos através da mesma técnica a expressão dos marcadores neuronais Neurofilamento M,  $\beta$ -tubulina III (Fig.17b-c) e Gap43 (Fig.18). Em ambas as condições experimentais, a grande maioria das células foram imunorreativas para os marcadores Neurofilamento M e  $\beta$ -tubulina III. Entretanto, uma menor proporção das células (entre 6-10%) apresentou a expressão dessas proteínas associada à uma morfologia semelhante à de neurônios maduros (Fig.17b'' e c''), a qual inclui características como volume citoplasmático reduzido, compactação do núcleo e presença de prolongamentos celulares. Não houve diferenças estatísticas entre as duas condições experimentais no que diz respeito à proporção de células positivas para Neurofilamento M e  $\beta$ -tubulina III, sugerindo que no contexto experimental esses não sejam marcadores apropriados para investigar o estado de diferenciação das células. Nos gráficos da figura 17 foram plotadas apenas as proporções de células positivas apresentando morfologia semelhante a de neurônios.

A expressão de Gap43 (*Growth-associated protein 43*, inglês para proteína associada a crescimento neuronal 43) foi detectada apenas nas culturas previamente tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>, em aproximadamente 2% do total de células (Fig.18).

**Figura 18 – Expressão do marcador neuronal Gap43 nas culturas pré-tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>.** Após 14 dias de diferenciação em meio indutivo, análises de imunofluorescência revelaram presença de células Gap43-positivas nas culturas pré-tratadas com os fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> (média de  $2,1 \pm 0,6\%$  do total de células). Células imunorreativas para Gap43 não foram detectadas na condição controle.

Embora a diferenciação em neurônios maduros provavelmente não tenha sido alcançada em nossas condições experimentais, esses resultados reforçam o papel do EGF e FGF<sub>2</sub> no comprometimento das EPI-NCSCs com a linhagem neuronal. Juntos eles sugerem que o tratamento com os fatores de crescimento permite as EPI-NCSCs responderem melhor ao estímulo à diferenciação neuronal.



## DISCUSSÃO

### **EPI-NCSCs e expressão de marcadores de células indiferenciadas**

O folículo piloso consiste em uma invaginação da epiderme responsável pela formação e crescimento dos pelos<sup>7,8</sup>. Tem sido proposto que o folículo piloso contém um repertório relativamente amplo de populações de células tronco, incluindo aquelas envolvidas na homeostase de toda a epiderme, glândulas sebáceas e própria estrutura do folículo<sup>45,46</sup>, além de células tronco mesenquimais<sup>47,48</sup> e células tronco de origem da CN<sup>22-24,29,34,36,38,40,41</sup>. Dentre as últimas, estão as chamadas células tronco epidermais da CN (EPI-NCSCs), descritas por Sieber-Blum e colaboradores em 2004. Tais células residem em uma discreta saliência do folículo piloso – o bulge – e apresentam *in vitro* a capacidade de se diferenciar na maioria dos derivados da CN, incluindo neurônios, células gliais, condrócitos, melanócitos e células de músculo liso<sup>24</sup>.

As descobertas de tais precursores multipotentes em tecidos adultos de fácil acesso como a pele são bastante promissoras, correspondendo à base do desenvolvimento de terapias celulares e processos biotecnológicos inovadores. Entretanto, de acordo com Ulloa-Montoya *et al.* (2005), além da identificação de fontes acessíveis de células tronco em tecidos adultos, a implementação de tecnologias com propósitos terapêuticos requer o desenvolvimento de metodologias para cultivo e propagação que permitam a manutenção da multipotencialidade e da capacidade de autorrenovação dessas células. Ainda segundo esses autores, uma etapa crucial da pesquisa básica com células tronco compreende a identificação de marcadores associados à multipotencialidade e/ou capacidade de autorrenovação das células.

Nesse trabalho, baseado nas metodologias de cultivo de células, RT-PCR e Imufluorescência, demonstramos que EPI-NCSCs isoladas de vibrissas de camundongos adultos podem ser caracterizadas pela expressão dos fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Sox9, Sox10 e Twist – os quais estão envolvidos em processos de migração e determinação de células da CN durante o desenvolvimento embrionário. Nossos resultados mostraram que essas células expressam também os marcadores protéicos p75NTR, fibronectina e, conforme já descrito por Sieber-Blum *et al.* (2004), nestina. Além de refletir o estado multipotente e indiferenciado dessas células, esse padrão de expressão de marcadores sugere que EPI-NCSCs chegam à pele durante o período embrionário e persistem até a vida adulta em um estado quiescente, possivelmente com o microambiente restringindo seu potencial *in vivo*.

Nossos resultados podem fornecer ainda maiores informações que eventualmente contribuirão para a compreensão das relações existentes entre as populações de células tronco derivadas da crista neural identificadas na pele: células tronco de melanócitos (MSCs), células precursoras da pele (SKPs) e EPI-NCSCs. Embora estejam em diferentes camadas da pele e do folículo piloso, tem se levantado a hipótese de que essas populações de células tenham uma origem comum e/ou interajam funcionalmente<sup>19,64</sup>.

Tal relação se torna plausível quando se leva em consideração que, durante o ciclo regular de desenvolvimento dos pelos, ocorre emigração de células do bulge para regiões mais basais do folículo e da papila dérmica para a bainha de tecido conjuntivo que recobre todo o folículo piloso<sup>46,79</sup>. É até mesmo possível que sob determinadas condições, SKPs e/ou EPI-NCSCs originem precursores com potencial mais restrito, como MSCs, ou que essas sejam uma mesma população de células em estágios diferentes de maturação ocupando nichos fisiológicos diferentes, porém próximos<sup>64</sup>. Os resultados aqui apresentados fornecem algumas evidências que contribuem com tal hipótese. Identificamos pela primeira vez um marcador em comum a essas três populações: Pax3, um fator de transcrição característico da CN embrionária e envolvido na determinação da linhagem melanocítica, cuja expressão até então só havia sido detectada em MSCs e SKPs<sup>22,80</sup>. Além disso, nossos resultados demonstram que EPI-NCSCs e SKPs compartilham também a expressão dos marcadores Slug e Snail, e das proteínas fibronectina e nestina conforme Fernandes e colaboradores (2004).

Outra questão digna de atenção diz respeito à identidade de MSCs e EPI-NCSCs – ambas identificadas na região da saliência do folículo piloso. Segundo Delfino-Machín *et al.* (2007) o fato de EPI-NCSCs exibirem um amplo potencial de diferenciação para os derivados da CN – incluindo melanócitos – sugere que essas células possam realmente dar origem às MSCs, as quais apresentam potencial restrito a melanócitos. De acordo com o mesmo autor, estudar a expressão de Pax3 - considerado um componente chave no mecanismo de manutenção do estado indiferenciado das MSCs – nas populações residentes no folículo piloso seria de extrema importância para tentar esclarecer as relações entre tais células.

Nesse contexto, além de detectar a expressão de Pax3, demonstramos que EPI-NCSCs são FoxD3 negativas. Se levarmos em consideração que as únicas populações de células da CN que não expressam FoxD3 são aquelas envolvidas com a linhagem

melanocítica<sup>28</sup>, categoria na qual se encaixa as MSCs, esse resultado está de acordo com as idéias já levantadas. Outra hipótese a ser considerada é que EPI-NCSCs e MSCs sejam a mesma população de células. Segundo por Fernandes *et al.* (2008), as EPI-NCSCs podem ser de fato MSCs que, quando cultivadas *in vitro*, readquirem multipotencialidade.

A região do bulge do folículo piloso tem sido descrita também como um reservatório de células tronco epidermais capazes de se diferenciar *in vitro* em queratinócitos, músculo liso, células gliais e neurônios<sup>35,81,82</sup>. Além disso, trabalhos mais recentes tem demonstrado o isolamento de células tronco mesenquimais a partir de culturas de explantes do folículo piloso humano<sup>47,48</sup>. Para nos certificarmos da identidade das células obtidas em nossas culturas primárias, analisamos a expressão das proteínas de superfície celular CD34, considerada um marcador das células tronco epidermais residentes no bulge<sup>66,67</sup>, e CD73, CD90 e CD105, os quais são característicos de células tronco mesenquimais<sup>65</sup>. A não expressão de tais marcadores, observada através da técnica de citometria de fluxo, demonstra que as EPI-NCSCs correspondem a uma população celular distinta das células tronco mesenquimais e epidermais presentes no folículo piloso.

### **EPI-NCSCs e expressão de marcadores de tipos celulares diferenciados**

Além da caracterização das culturas primárias, as análises de imunofluorescência revelaram um aspecto interessante das EPI-NCSCs. Mesmo em condições básicas de cultivo (i.e., sem o uso de algum fator específico que estimule a diferenciação celular), a grande maioria das células expressam proteínas consideradas pela literatura como marcadores neuronais ( $\beta$ -tubulina III e Neurofilamento M) e glial (GFAP), embora não apresentem propriedades morfológicas de neurônios.

A expressão espontânea de marcadores neurais, incluindo  $\beta$ -tubulina III, Neurofilamento M, GFAP e S100 $\beta$ , tem sido descrita também em populações de células tronco mesenquimais<sup>83-87</sup>. Entretanto, a natureza e as implicações da expressão desses marcadores em células indiferenciadas não são completamente entendidas. Alguns trabalhos a consideram como uma demonstração da capacidade intrínseca das células tronco mesenquimais em gerar derivados neurais via transdiferenciação<sup>84,87</sup>, enquanto outros fornecem evidências que demonstram a expressão *in vitro* desses marcadores como um resultado

de estresse celular em resposta a remoção das células de seu nicho fisiológico e crescimento em condições artificiais em cultura<sup>85,86</sup>

Embora demonstrem a expressão de marcadores neurais em EPI-NCSCs indiferenciadas, nossos resultados não são capazes de explicar a natureza dessa observação. Novos experimentos são, portanto, necessários para esclarecer se a expressão de tais marcadores reflete a pré-disposição das EPI-NCSCs em se diferenciar em células neurais (hipótese plausível devido ao fato dessas células serem derivadas da CN) ou se é um resultado de adaptações celulares em resposta ao cultivo *in vitro*.

### **Uso do EGF e FGF<sub>2</sub> como alternativa para expansão *in vitro* das EPI-NCSCs**

A expansão *in vitro* de células tronco constitui uma etapa fundamental para o desenvolvimento de terapias celulares futuras ou para o uso dessas como ferramenta de pesquisa e para teste de fármacos *in vitro*. Um grande esforço tem sido efetuado no sentido de definir condições de cultivo ideais para a expansão de várias populações de células tronco adultas. Tais condições devem promover o aumento no número de células, evitar a perda da capacidade de autorrenovação e manter as células indiferenciadas<sup>53</sup>. Nesse sentido, muitos aspectos do cultivo celular tem sido otimizados, como o recipiente de cultura, a densidade de semeadura, os protocolos de manutenção e subcultivo, assim como a composição do meio e a tensão de oxigênio<sup>88</sup>. Outro aspecto bastante investigado tem sido o efeito de determinados fatores de crescimento. Muitos desses fatores são capazes de inibir a apoptose, induzir a proliferação celular e até mesmo prevenir a diferenciação. Além disso, fatores de crescimento específicos podem ser também utilizados na obtenção de uma linhagem celular de interesse a partir de células tronco multipotentes<sup>53</sup>.

Com o intuito de aperfeiçoar um protocolo que permita a expansão de EPI-NCSCs optamos por analisar, no subcultivo dessas células, os efeitos da combinação dos os fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub>. Esses fatores são capazes de estimular a proliferação e a manutenção da plasticidade celular, bem como modular a diferenciação de diversos tipos celulares<sup>8,69-71,89</sup>.

Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que, em modelo de aves, o FGF<sub>2</sub> estimula a renovação e a proliferação de precursores indiferenciados e multipotentes da CN, mantendo-os indiferenciados<sup>8</sup>. No cultivo de células tronco mesenquimais, resultados obtidos por Jeremias (2009), sugerem ainda que o FGF<sub>2</sub> mantém tais

células em estado indiferenciado e de alta proliferação, enquanto o EGF leva ao comprometimento com a linhagem neural, embora não seja capaz de induzir a diferenciação final dessas células<sup>90</sup>. Além disso, resultados obtidos por Toma e colaboradores<sup>41</sup> demonstram que presença de EGF e FGF<sub>2</sub> no meio de cultivo é indispensável para a obtenção e manutenção, sem perda de potencialidade, de células precursoras da pele humanas (SKPs). Na presença dos fatores de crescimento, tais células puderam ser mantidas em cultura por pelo menos um ano.

No presente trabalho, demonstramos que o tratamento simultâneo com EGF e FGF<sub>2</sub> é capaz de estimular a proliferação celular e, conseqüentemente, facilita a expansão em cultivo das EPI-NCSCs. Ao mesmo tempo, o tratamento com os fatores de crescimento mantém a expressão de marcadores moleculares associados ao estado indiferenciado e multipotente de células da CN, tais como o receptor de membrana p75 e os fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Sox9, Sox10 e Twist.

Entretanto, com a metodologia empregada nesse estudo não fomos capazes de responder com precisão o quanto o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> afeta a expressão dos fatores de transcrição citados acima. Embora sugiram uma diminuição nos níveis de expressão de mRNA desses genes nas culturas tratadas, tais resultados devem ser interpretados com cuidado uma vez que a expressão de Gapdh, gene de referência utilizado como normalizador das reações de RT-PCR real time, parece estar sendo afetada pelo tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub>.

O método de quantificação relativa pela equação de Pffalf<sup>56</sup> – o qual foi utilizado nesse trabalho – é baseado nos níveis de expressão do(s) gene(s) de interesse em relação expressão de um gene de referência (ou gene *housekeeping*). O gene de referência serve como normalizador da quantidade e qualidade do cDNA presente nas amostras de cada condição experimental. Dessa forma, para produzir resultados confiáveis, o método de quantificação relativa requer o uso de um gene de referência cuja expressão não é afetada pelas condições experimentais<sup>91,92</sup>. Embora o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Gapdh) continue a ser utilizado como um gene normalizador, vários estudos tem reportado problemas associados ao seu uso. Já é bem estabelecido que a expressão de Gapdh não é constante na célula. Além de sua função na glicólise, tem se tornou evidente que o Gapdh contribui para uma série de funções celulares, tais como como exportação de moléculas de RNA no núcleo, replicação e reparo de DNA, fusão de membrana exocíticas e organização do citoesqueleto<sup>93</sup>.

Em nosso estudo parece haver um aumento na expressão de Gapdh nas células tratadas com EGF e FGF<sub>2</sub>, o qual é evidenciado pela diminuição de aproximadamente 2 ciclos no Ct médio - o que representa um aumento em aproximadamente 4 vezes na expressão de Gapdh – nas amostras de cDNA da condição EGF + FGF. Dessa forma, a aparente diminuição na expressão dos fatores de transcrição Pax3, Slug, Snail, Sox9 e Sox 10 nas culturas tratadas (conforme mostrado na figura 8b) pode ser um resultado enviesado pelo aumento na expressão de Gapdh. Assim, a repetição do experimento é necessária para uma conclusão definitiva. O uso de outros genes de referência cuja expressão não é regulada pelas condições experimentais podem facilitar as análises. Possíveis candidatos incluem  $\beta$ -actina, ciclofilina, e rRNA 28S<sup>56</sup>.

### **Efeito do EGF e FGF<sub>2</sub> sobre o potencial de diferenciação neuronal *in vitro* das EPI-NCSCs**

Trabalhos recentes tem demonstrado que os fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub>, além de potentes mitógenos, são também capazes favorecer o isolamento e de influenciar o processo de comprometimento celular de vários precursores multipotentes. A combinação desses fatores de crescimento tem sido extensivamente utilizada, por exemplo, na derivação e manutenção de células tronco/precuroras neurais presentes no sistema nervoso central em desenvolvimento e adulto, ou a partir de linhagens de células tronco embrionárias e de pluripotência induzida<sup>94-98</sup>.

O regime tradicionalmente utilizado para o isolamento e a manutenção de células tronco neurais nesses estudos corresponde à técnica de cultivo em suspensão<sup>99</sup>. Nesse sistema, células isoladas de regiões específicas do sistema nervoso central, quando cultivadas na presença de elevadas concentrações de EGF e/ou FGF<sub>2</sub>, formam agregados celulares não aderentes conhecidos como neuroesferas<sup>94,100</sup>. As neuroesferas consistem predominantemente de uma mistura progenitores neurais – com capacidade de diferenciação em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos – que, sob condições adequadas e na presença de EGF e/ou FGF<sub>2</sub>, podem ser propagados por longos períodos de tempo em cultura<sup>96,101</sup>.

Baseado nesses trabalhos prévios, outros trabalhos vem demonstrando que a combinação dos mitógenos EGF e FGF<sub>2</sub> é eficiente também na geração e manutenção de linhagens de células tronco neurais em sistema de cultivo aderente. Tais linhagens celulares já foram isoladas do sistema nervoso central de camundongos e humanos em idade fetal e adulta, de amostras de tumores cerebrais humanas, e

também a partir da diferenciação de linhagens de células tronco embrionárias. Quando cultivadas na presença de EGF e FGF<sub>2</sub> essas células são morfológicamente homogêneas, proliferam continuamente através de divisões simétricas, expressam marcadores de precursores neurais – tais como nestina, Sox2, vimentina e CD44. Além disso, tais células mantêm potencial clonogênico e de diferenciação em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos<sup>71,89,102,103</sup>.

Além do papel da geração e manutenção das linhagens de células tronco citadas, tem se demonstrado que os fatores EGF e FGF<sub>2</sub> promovem também aumento da capacidade de diferenciação neuronal *in vitro* de células tronco mesenquimais adultas. Nesse contexto, mostrou-se que a exposição aos fatores tanto em culturas aderentes quanto não aderentes estimula a expressão de nestina e facilita a neurogênese *in vitro*<sup>70,104–107</sup>. Além disso, tem sido descrita a diferenciação de células tronco mesenquimais, após pré-tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub>, em células produtoras de dopamina, as quais são capazes de levar a uma melhora funcional em modelo animal de doença de Parkinson<sup>108,109</sup>.

Uma vez demonstrado que EPI-NCSCs já expressam genes neurais - como nestina,  $\beta$ -tubulina III, Neurofilamento e GFAP – levantamos a hipótese de que a exposição aos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub>, além de estimular a proliferação, poderia aumentar a capacidade de diferenciação neuronal dessas células. Essa hipótese é suportada por dados obtidos em nosso laboratório que demonstram que a combinação de EGF e o FGF<sub>2</sub> promove a diferenciação neuronal das células da crista neural durante o período embrionário<sup>69</sup>.

Nesse contexto, vários de nossos resultados vieram a corroborar com a hipótese inicial. Demonstramos primeiramente que o tratamento com EGF e FGF<sub>2</sub> em combinação promove aumento na expressão do marcador neuronal  $\beta$ -tubulina III bem como a aquisição de morfologia celular semelhante a de neurônios. Tais células  $\beta$ -tubulina III muito provavelmente correspondem à precursores neuronais imaturos, o que é evidenciado pela expressão da proteína de filamento intermediário nestina e o receptor celular p75NTR. Concomitantemente ao aumento de  $\beta$ -tubulina III, verificamos uma redução na expressão de  $\alpha$ -SMA e GFAP, considerados marcadores mesenquimal e glial, respectivamente. Juntos esses resultados sugerem que a exposição aos fatores de crescimento favorecem o comprometimento das EPI-NCSCs com a linhagem neuronal às expensas da linhagem mesenquimal e glial.

Adicionalmente, nossos resultados demonstram que um pré-tratamento com os fatores EGF e FGF<sub>2</sub> aumenta a capacidade de

diferenciação neuronal *in vitro* das EPI-NCSCs, o que é evidenciado pelo aumento na expressão de Mash-1 após a indução da diferenciação. Apesar de o Mash-1 ser um fator de transcrição essencial para a diferenciação neuronal, um fenótipo neuronal completamente maduro foi obtido em uma pequena proporção em nossas condições experimentais – como demonstrado pelo baixo número de células morfológicamente distintas e imunorreativas para  $\beta$ -tubulina III, neurofilamento M, ou Gap43.

Embora um protocolo de diferenciação mais eficiente se mostre necessário, nossos resultados evidenciam as vantagens da exposição aos fatores EGF e FGF<sub>2</sub> na indução neuronal. Acreditamos que um protocolo envolvendo uma etapa inicial de tratamento com esses fatores possa ser uma alternativa atrativa e de fácil implementação para o uso das EPI-NCSCs em terapias celulares e/ou na geração de linhagens de células neuronais. A figura 19, a seguir, sumariza os principais resultados obtidos ao longo do presente trabalho.

Figura 19 – Representação esquemática dos resultados obtidos ao longo do trabalho. Utilizando a metodologia descrita por Sieber-Blum e colaboradores (2004), isolamos EPI-NCSCs indiferenciadas que, quando expostas aos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub>, proliferam mais rapidamente e se comprometem com a linhagem neuronal. O comprometimento com tal linhagem é evidenciado pelo aquisição de morfologia característica, aumento na expressão de  $\beta$ tubulina III e aumento na resposta ao estímulo de diferenciação neuronal.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, avanços na pesquisa com células tronco tem trazido à tona a possibilidade de futuras terapias regenerativas utilizando essas células. Entretanto, o desenvolvimento de aplicações terapêuticas e/ou biotecnológicas requer inicialmente uma longa etapa de pesquisa básica para que a identidade e as características celulares e moleculares dessas células sejam melhor entendidas. Para o sucesso de tais terapias é necessário também que células tronco sejam expandidas antes de serem transplantadas e que, de alguma forma, sejam capazes de se diferenciar no tipo celular de interesse após transplantadas.

Nesse contexto de pesquisa básica envolvendo células tronco, nosso trabalho demonstrou que EPI-NCSCs podem ser caracterizadas pela expressão de genes e marcadores protéicos característicos da CN embrionária, o que fornece dados para uma melhor compreensão da identidades das mesmas. Nossos resultados sugerem ainda que essas células podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* e que a combinação dos fatores de crescimento EGF e FGF<sub>2</sub> pode ser útil na obtenção de uma linhagem neuronal a partir dessa população de células.

Esperamos que esses dados sejam relevantes no delineamento de estudos futuros e/ou de aplicações biotecnológicas envolvendo as células tronco epidermais derivadas da CN.

## **REFERÊNCIAS**

1. Douarin NM Le, Dupin E. The neural crest in vertebrate evolution. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(4):381–9.
2. Taylor KM, LaBonne C. Modulating the activity of neural crest regulatory factors. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(4):326–31.
3. Douarin NM Le, Kalcheim C. *The Neural Crest*. Second Edi. Cambridge: Cambridge University Press; 1999:445.
4. Gilbert SF. *Developmental Biology*. Ninth. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 2010:711.
5. Dupin E, Calloni GW, Douarin NM Le. Perspectives of Stem Cells Ulrich H, ed. 2010.
6. Snider P, Olaopa M, Firulli AB, Conway SJ. Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. *The Scientific World Journal*. 2007;7:1090–113.
7. Trentin A, Glavieux-Pardanaud C, Douarin NM Le, Dupin E. 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*. 2004;101(13):4495–500.
8. Bittencourt DA, Costa MC da, Calloni GW, Alvarez-Silva M, Trentin AG. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes the Self-Renewal of Bipotent Glial Smooth Muscle Neural Crest Progenitors. *Stem cells and development*. 2013;22(8):1241–1251.
9. Douarin NM Le, Calloni GW, Dupin E. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*. 2008;7(8):1–7.
10. Cohen AM, Konigsberg IR. A Clonal Approach to the Problem of Neural Crest Determination1. *Developmental Biology*. 1975;280:262–280.
11. Bronner-Fraser M, Fraser SE. Cell lineage analyses reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature*. 1988;335:161–164.
12. Lièvre CS Le, Douarin NM Le. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1975;34(1):125–54.
13. Baroffio a, Dupin E, Douarin NM Le. Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development*. 1991;112(1):301–5.
14. Calloni GW, Douarin NM Le, Dupin E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(22):8947–52.

15. Dupin E, Glavieux C, Vaigot P, Douarin NM Le. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):7882–7.
16. Dupin E, Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, Douarin NM Le. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5229–33.
17. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Douarin NM Le, Dupin E. Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Developmental Biology*. 2006;2:656–669.
18. Douarin NM Le, Creuzet S, Couly G, Dupin E. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*. 2004;131(19):4637–50.
19. Delfino-Machín M, Chipperfield TR, Rodrigues FSLM, Kelsh RN. The proliferating field of neural crest stem cells. *Developmental dynamics*. 2007;236(12):3242–54.
20. Shakhova O, Sommer L, Biology D. Neural crest-derived stem cells. *StemBook*. 2010:1–20.
21. Trentin AG, Calloni GW. The Neural Crest and the Stem Cells of Neural Crest. In: Goldenberg RC dos S, Carvalho ACC de, eds. *Resident Stem Cells*. 1a ed. Waltham, MA: Academic Press; 2013:157–176.
22. Fernandes KJL, McKenzie I a, Mill P, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology*. 2004;6(11):1082–93.
23. Li H-Y, Say EHM, Zhou X-F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem cells*. 2007;25(8):2053–65.
24. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Developmental dynamics*. 2004;231(2):258–69.
25. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *The Journal of cell biology*. 2005;170(7):1135–46.
26. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem cells*. 2006;24(12):2714–22.
27. Jinno H, Morozova O, Jones KL, et al. Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem cells*. 2010;28(11):2027–40.

28. Nelms BL, Labosky. PA. *Transcriptional Control of Neural Crest Development*. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
29. Nishimura EK, Jordan S a, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*. 2002;416(6883):854–60.
30. Gronthos S, Brahim J, Li W, et al. Stem Cell Properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*. 2002;81:531–535.
31. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13625–30.
32. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(10):5807–12.
33. Coura GS, Garcez RC, Aguiar CBNM de, et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *Journal of periodontal research*. 2008;43(5):531–6.
34. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*. 2001;3(9):778–84.
35. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(15):5530–5534.
36. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of Cell Biology*. 2006;175(6):1005–15.
37. Yu H, Kumar SM, Kossenkov A V, Showe L, Xu X. Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(5):1227–36.
38. Clewes O, Narytnyk A, Gillinder KR, et al. Human Epidermal Neural Crest Stem Cells (hEPI-NCSC)-Characterization and Directed Differentiation into Osteocytes and Melanocytes. *Stem cell reviews*. 2011.
39. Sviderskaya E V, Easty DJ, Lawrence M a, et al. Functional neurons and melanocytes induced from immortal lines of postnatal neural crest-like stem cells. *FASEB journal*. 2009;23(9):3179–92.
40. Krejci E, Grim M. Isolation and Characterization of Neural Crest Stem Cells from Adult Human Hair Follicles. *Stem Cells*. 2010;157:149–157.

41. Toma JG, McKenzie I a, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem cells*. 2005;23(6):727–37.
42. McKenzie I a, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(24):6651–60.
43. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *The Journal of neuroscience*. 2007;27(36):9545–59.
44. Lavoie J-F, Biernaskie J a, Chen Y, et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem cells and development*. 2009;18(6):893–906.
45. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13473–5.
46. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 2000;102(4):451–61.
47. Wang Y, Liu J, Tan X, et al. Induced Pluripotent Stem Cells from Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cells. *Stem cell reviews*. 2012.
48. Bajpai VK, Mistrionis P, Andreadis ST. Clonal multipotency and effect of long-term in vitro expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research*. 2012;8(1):74–84.
49. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585–95.
50. Hu YF, Zhang Z-J, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem cells*. 2006;24(12):2692–702.
51. Borojevic R. Terapias celulares: promessas e realidades. *Ciência Hoje*. 2004.
52. Kitambi SS, Chandrasekar G. Stem cells : a model for screening , discovery and development of drugs. *Stem Cells and Cloning - Advances and Applications*. 2011;4:51–59.
53. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W-S. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;100(1):12–27.
54. Sieber-Blum M, Hu Y. Mouse epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) cultures. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2008;(15):2–3.

55. Liu Q, Spusta SC, Mi R, et al. Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells: induction, maintenance, and differentiation into functional schwann cells. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(4):266–78.
56. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
57. Posser T, Aguiar C de, Garcez R, et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Archives of Toxicology*. 2007;81(6):407–414.
58. Meulemans D, Bronner-Fraser M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental cell*. 2004;7(3):291–9.
59. STEMPLE DL, ANDERSON DJ. Isolation of a stem-cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*. 1992;71:973–985.
60. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999;96(5):737–49.
61. Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L. Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*. 2002;11(24):3075–85.
62. Park D, Xiang AP, Mao FF, et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem cells*. 2010;28(12):2162–71.
63. Andressen C, Stöcker E, Klinz FJ, et al. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem cells*. 2001;19(5):419–24.
64. Fernandes KJL, Toma JG, Miller FD. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2008;363(1489):185–98.
65. Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
66. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(4):501–11.
67. Morris RJ, Liu Y, Marles L, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature biotechnology*. 2004;22(4):411–7.

68. McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, et al. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood*. 2009;114(2):268–78.
69. Garcez RC, Teixeira BL, Schmitt SDS, Alvarez-Silva M, Trentin AG. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009;29(8):1087–91.
70. Delcroix GJ-R, Curtis KM, Schiller PC, Montero-Menei CN. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation; research in biological diversity*. 2010;80(4-5):213–27.
71. Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cerebral cortex*. 2006;16 Suppl 1:i112–20.
72. Silva Meirelles L da, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 11):2204–13.
73. Grcevic D, Pejda S, Matthews BG, et al. In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells. *Stem cells*. 2012;30(2):187–96.
74. Hinz B, Pittet P, Chaponnier C, Meister J. Myofibroblast Development Is Characterized by Specific Cell-Cell Adherens Junctions. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15(September):4310–4320.
75. Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development*. 1998;125(4):599–608.
76. Casarosa S, Fode C, Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*. 1999;126(3):525–34.
77. Parras CM, Galli R, Britz O, et al. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO journal*. 2004;23(22):4495–505.
78. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
79. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. 2004;118:635–648.
80. Osawa M, Egawa G, Mak S-S, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development*. 2005;132(24):5589–99.
81. Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(49):17734–8.
82. Hoffman RM. The Pluripotency of Hair Follicle Stem Cells. *Cell Cycle.* 2006;5(3):232–233.
83. Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *Journal of cell science.* 2003;116(Pt 16):3295–302.
84. Foudah D, Redondo J, Caldara C, et al. Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2012;2012:820821.
85. Croft AP, Przyborski S a. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2006;24(8):1841–51.
86. Rooney GE, Howard L, O'Brien T, Windebank AJ, Barry FP. Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. *Stem cells and development.* 2009;18(3):387–98.
87. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation; research in biological diversity.* 2004;72(7):319–26.
88. Abdelhay ESWF, Paraguaçu-Braga FH, Binato R, Bouzas LFS. Células-tronco de origem hematopoéticas: expansão e perspectivas de uso terapêutico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2009;31(55 21):2–8.
89. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell stem cell.* 2009;4(6):568–80.
90. Jeremias, T.. Efeito dos fatores FGF-2, EGF e  $\beta$ -Catenina no potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais de placenta humana. Dissertação de mestrado em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009:78.
91. Bustin S a. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology.* 2002;29(1):23–39.
92. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, ed. *A-Z of quantitative PCR.* La Jolla: International University Line; 2004:87–112.

93. Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Molecular and cellular probes*. 2000;14(2):127–35.
94. Reynolds B, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707–1710.
95. Lujan E, Wernig M. The many roads to Rome: induction of neural precursor cells from fibroblasts. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(5):517–22.
96. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001;414:112–117.
97. Tsai RYL, Kim S. Fibroblast growth factor 2 negatively regulates the induction of neuronal progenitors from neural stem cells. *Journal of neuroscience research*. 2005;82(2):149–59.
98. Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus A. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Cell and Tissue Research*. 2001;305(2):171–176.
99. Danovi D, Folarin A a, Baranowski B, Pollard SM. High content screening of defined chemical libraries using normal and glioma-derived neural stem cell lines. *Methods in enzymology*. 2012;506:311–29.
100. Reynolds B a, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992;12(11):4565–74.
101. Campos LS. Neurospheres: Insights Into Neural Stem Cell Biology. *Journal of Neuroscience Research*. 2004;78:761–769.
102. Sun Y, Pollard S, Conti L, et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Molecular and cellular neurosciences*. 2008;38(2):245–58.
103. Conti L, Pollard SM, Gorba T, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology*. 2005;3(9):e283.
104. Song S, Song S, Zhang H, Cuevas J, Sanchez-Ramos J. Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells. *Stem cells and development*. 2007;16(5):747–56.
105. Hermann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 19):4411–22.

106. Kim S, Honmou O, Kato K, et al. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain research*. 2006;1123(1):27–33.
107. Yang Q, Mu J, Li Q, et al. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(4):520–4.
108. Levy YS, Bahat-Stroomza M, Barzilay R, et al. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy*. 2008;10(4):340–52.
109. Barzilay R, Kan I, Ben-Zur T, et al. Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols. *Stem cells and development*. 2008;17(3):547–54.