

Ana Belén Ramos Hryb

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS
CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE AVES
CULTIVADAS SOBRE MATRIGEL.**

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

Orientador: Prof. Dr. Giordano W. Calloni.

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Trentin.

Florianópolis
2013

**Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina**

Ramos Hryb, Ana Belén

Avaliação do potencial de diferenciação das células da crista neural truncal de aves cultivadas sobre Matrigel. / Ana Belén Ramos Hryb ; orientador, Giordano Wosgrau Calloni ; co-orientadora, Andrea Trentin. - Florianópolis, SC, 2013.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Matrigel. 3. Diferenciação de células da Crista Neural Truncal. 4. Microambientes 2D e 3D. 5. Condrogênese. I. Wosgrau Calloni, Giordano. II. Trentin, Andrea. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.


**“Avaliação do potencial de diferenciação das
células da Crista Neural truncal de aves
cultivadas sobre Matrigel”**

por

ANA BELÉN RAMOS HRYB

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros titulares da Banca Examinadora
(Port. 07/PPGBCD/2013) do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento - UFSC, composta pelos
Professores Doutores:

Orientador:



Prof(a). Dr(a). Jordano Wosgrau Calloni (Presidente/Orientador)

Coorientadora:



Andrea Gonçalves Trentin (BEG/CCB/UFSC)


Banca examinadora:



Prof(a). Dr(a). Carla Tasca (BQA/CCB/UFSC)




Prof(a). Dr(a). Ricardo Castilho Garcez (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a). Evelise Maria Nazari (BEG/CCB/UFSC)

Coordenadora:



Prof(a). Dra. Yara Maria Rauh Muller
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Florianópolis, 21 de junho de 2013.

Dedico esta dissertação

A mi Madre, mi ángel y guía espiritual, ejemplo de fortaleza,
de humildad y de amor incondicional...

A mi Padre, mi ejemplo de vida y de amor infinito, quien me
enseñó a ser guerrera, paciente y perseverante frente a los
desafíos de este camino...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Giordano Wosgrau Calloni, pela oportunidade de integrar a equipe de trabalho de Células Tronco. Obrigada por abrir esta porta no meu caminho como pesquisadora. Obrigada pela paciência e a confiança depositada. Obrigada pela compreensão, a disponibilidade em todo momento e pelos ensinamentos para a ciência e para a vida.

À minha co-orientadora Andréa Gonçalves Trentin, pelos ensinamentos e pela ajuda em todo momento.

A Meline Da Costa Coelho, pelos ensinamentos, a paciência e a ajuda em todo momento. Obrigada por participar e colaborar diretamente neste trabalho, especialmente com a obtenção de imagens das culturas sobre o Matrigel.

A Flavio Augusto, especialmente pela amizade, o apoio constante, a ajuda e a colaboração direta neste trabalho.

A Maiara e Bia pelo apoio e a ajuda constante durante a sua estadia no laboratório.

A Ricardo Garcez, pelas discussões científicas, pelo apoio e os conselhos para a vida.

A Evelise Nazari, por semear em mim o estímulo e a vontade de ser professora. Obrigada pelo exemplo como pesquisadora e pelos ensinamentos para a ciência e para a vida.

A Andréa Marrero, pelo apoio, a confiança, as forças positivas e pelos conselhos. Obrigada por ser um exemplo de professora e pesquisadora.

Obrigada aos meus colegas de laboratório, pela ajuda direta ou indireta em todo momento. Em especial, a Talita e Denise pela ajuda no momento da escrita deste trabalho. Obrigada Diego, Bia, Priscila, Addeli, Camila, Fernanda, Diego, Mari, Michele, Pati, Aloisio, Silvia, Gabriel, Mabilia por fazer a minha estadia mais divertida e satisfatória.

A meus colegas da Pós-graduação, os professores e o pessoal administrativo, em especial a Rodrigo, Vivi, Fabiana, Gilian, Eliane, Mariah, Tici, Yago, Fer pelo companheirismo, a ajuda constante e os sorrisos que fizeram os meus dias mais alegres.

Gracias a mis amigos de la vida. Gracias por el apoyo, los mates, las visitas, los abrazos, los cachetazos (con cariño) y por todo lo que me enseñaron. Esto que logro hoy es también fruto de ustedes. Gracias Lucia, Ruth, Michael, Adriana, Thiago, Cintia, Ale, por hacerme ver

siempre lo positivo, por creer en mí y darme la fuerza cuando me faltaba.

A mi familia del corazón, Yoli y Pancho, por entrar en mi vida justo para apoyarme en los momentos que más necesitaba, gracias por el apoyo, su confianza y los rezos que encomendaron para que todo conspira a mi favor.

A mi novio, mi amor y mi mejor amigo, Mauro Ramírez por estar siempre a mi lado, por ser mi ángel de la guardia. Gracias por creer en mí cuando yo no lo hacía, por darme las fuerzas que necesitaba, por transmitirme tu paciencia, por estar a mi lado cada noche de desvelo y por ayudarme a crecer en este proceso.

A mi familia de sangre. A mi madre que desde el cielo siempre me guarda, me cuida y vela por nosotros. A mi padre por su manera férrea de remar en contra de la corriente, siempre con una tenacidad que me contagia. Por tu amor incondicional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado, e também às agências financiadoras FAPESC, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), INTT, e PRONEX/CNPq.

Não perca o tempo mentalizando o tamanho da escada, suba o primeiro degrau e saberá que é capaz...

M. L. Pontes

*All that you touch
You Change.
All that you Change
Changes you.
The only lasting truth
Is Change.*

OCTAVIA BUTLER (1998)

RESUMO

RAMOS HRYB, Ana Belén. **Avaliação do potencial de diferenciação das células da crista neural truncal de aves cultivadas sobre Matrigel**. Florianópolis, 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2013.

A Crista Neural (CN) constitui uma população de células que emergem a partir das pregas dorsais do neuroepitélio durante a neurulação. Estas células migram ao longo de todo o eixo antero-posterior embrionário dos vertebrados até encontrarem seus locais definidos onde irão diferenciar em diversos derivados neurais e mesenquimais. As células da CN cefálica (CNC) e da CN Truncal (CNT) podem dar origem a neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, melanócitos e células endócrinas. Diferentemente do que ocorre com a CNC, a CNT possui uma limitada capacidade de originar elementos mesenquimais *in vivo*. Entretanto, sob determinadas condições *in vitro*, a CNT pode originar fenótipos mesenquimais. Até o momento, a maior parte dos estudos com a CNT foram realizados sobre substratos bidimensionais (2D), geralmente revestidos moléculas isoladas da matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina) ou sobre monocamadas de fibroblastos embrionários (3T3). Atualmente, sabe-se que este tipo de ambiente não reflete a complexa fisiologia dos tecidos *in vivo*. No presente estudo nós realizamos cultivos de células isoladas da CNT sobre um extrato solúvel da membrana basal, comumente denominado de Matrigel. Elaboramos uma metodologia que permitiu criar dois microambientes dentro do mesmo poço de cultivo: um ambiente bidimensional (2D) e um ambiente tridimensional (3D). Verificamos que o Matrigel permite a diferenciação dos principais fenótipos da CNT (neurais: células gliais, células musculares lisas, neurônios, melanócitos e mesenquimais: condrócitos). Embora tenham sido observadas algumas variações na obtenção dos fenótipos descritos conforme o lote de Matrigel utilizado, o uso de uma mistura destes lotes permitiu normalizar a frequência de poços de cultivo contendo cada tipo celular. Além disso, 70% dos poços de cultivo apresentavam nódulos de

cartilagem, os quais frequentemente se encontravam na região 3D. Interessantemente, esta frequência de condrócitos detectada utilizando um microambiente 3D de Matrigel, resultou ser muito maior quando comparado a trabalhos anteriores realizados sobre ambientes 2D convencionais. Estes dados sugerem que o Matrigel pode ser um ótimo substrato para estudar a diferenciação e multipotencialidade das células da CN.

Palavras chave: Matrigel, Crista Neural Truncal, diferenciação celular, condrogênese, microambiente 3D.

ABSTRACT

RAMOS HRYB, Ana Belén. **Avaliação do potencial de diferenciação das células da crista neural truncal de aves cultivadas sobre Matrigel.** Florianópolis, 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2013.

The Neural Crest (NC) is a cell population that detach from dorsal neural folds during neurulation. These cells migrate along the entire vertebrate embryonic axis until they find their final destination and differentiate into both neural and mesenchymal phenotypes. Cephalic NC (CNC) and Trunk NC cells (TNCCs) give rise to neurons and glia from the peripheral nervous system, melanocytes and endocrine cells. Differently from CNC, TNC have a limited capacity to give rise to mesenchymal derivatives *in vivo*. Nevertheless, under special culture conditions, TNC can give rise to mesenchymal phenotypes. Until now, most of studies of TNC were conducted on 2D substrates, usually covered with extracellular matrix molecules (*e.g.* collagen, laminin, fibronectin) or under fibroblast feeder-layers (3T3). Nowadays, it is worth knowing that this kind of environment does not mimic the complex tissue physiology *in vivo*. In the present study, we conducted cell cultures isolated from TNC on a soluble extract of basal membrane, commonly named Matrigel. We performed a new methodology that permitted to create two microenvironments in the same culture well: a two-dimensional (2D) and a three-dimensional (3D) environment. We observed that Matrigel permits the differentiation of the main TNC phenotypes (glial cells, melanocytes, smooth muscle cells, neurons and chondrocytes). Even though we observed some described variations on the phenotypes obtained according to the Matrigel lot used, the use of a mixture of lots allowed normalizing the frequency of culture wells containing each cell type. Moreover, 70% of culture wells contained cartilage nodules, which were frequently on the 3D zone. Interestingly, this frequency of chondrocytes detected using a 3D microenvironment of Matrigel resulted even higher than previous reports performed on traditional 2D cultures. Together, this data suggest that Matrigel could

be an excellent substrate to study NC differentiation and multipotenciality.

Key words: Matrigel, Trunk Neural Crest, cell differentiation, chondrogenesis, 3D microenvironment.

LISTA DE ABREVIATURAS

2D: Bidimensional
3D: Tridimensional
AIP (do inglês): Porta intestinal anterior
ANOVA: Análise de Variância
Ap2: Proteína de ativação 2
BDNF (do inglês): Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP (do inglês): Proteína Morfogenética de Osso
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CN: Crista Neural
CNC: Crista Neural Cefálica
CNT: Crista Neural Truncal
CO2: Dióxido de Carbono
CTGF (do inglês): Fator de crescimento de tecido conjuntivo
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE: Extrato de Embrião
EGF (do inglês): Fator de Crescimento Epidermal
EHS: Engelbreth-Holm-Swarm
ET3: Endotelina tipo 3
FGF (do inglês): Fator de Crescimento de Fibroblasto
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GRN (do inglês): Rede gênica regulatória
HNK1 (do inglês): Natural Killer Humano 1
HSP (do inglês): Proteína de choque térmico
IGF (do inglês): Fatores de crescimento semelhantes à insulina
KLF: kruppel-like fator 6/15
MEC: Matriz extracelular
MeEM: Marcador precoce de melanócitos.
NGF (do inglês): Fator de crescimento nervoso
NT3: Neurotrofina 3
PBS: Tampão fosfato salino
PDGF (do inglês): Fator de crescimento derivado de plaquetas
PN: Placa Neural
RBM: Reconstituted basement membrane
SBF: Soro bovino fetal

SCF (do inglês): Fator de célula tronco
Shh: Sonic hedgehog
TEM: Transição epitélio-mesenquimal
TGF β 1 (do inglês): fator de crescimento transformante β 1
TN: Tubo neural
TxRed: Texas red
Wnt: Wingless
 α -MEM: Meio Alfa Essencial Mínimo
 α -tubIII: Tubulina α -III
 α -SMA: alfa actina de músculo liso
%: Por cento
 χ^2 : qui-quadrado
<: menor que
g: Grama
L: litro
mg: miligrama
min: minuto
mL: mililitro
mm: Milímetro
°: Grau
 α : Alfa
 β : Beta
 μ g: Micrograma
 μ L: Microlitro
 μ M: Micromolar

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A formação da CN.....	2
Figura 2: Esquema representativo dos genes e as vias de sinalização que regulam o desenvolvimento das células da CN.....	3
Figura 3: Sistema de quimeras galinha-codorna desenvolvido por Nicole Le Douarin.....	7
Figura 4: Rotas migratórias da CNC e da CNT.....	9
Figura 5: Mapa de destino das células da CN.....	10
Figura 6: Metodologia de cultura clonal desenvolvida por Cohen e Königsberg (1975).....	13
Figura 7: Comparação do mapa de destino e do mapa de potencialidades das células da CN.....	15
Figura 8: Esquema representativo dos aspectos que afetam as células cultivadas em superfícies 2D e 3D.....	18
Figura 9: Crescimento de células de melanoma B16C3 sobre Matrigel versus controle.....	22
Figura 10: Imagens ilustrativas da migração das células da CN num ambiente 3D e um ambiente plano.....	23
Figura 11: Diferenciação <i>in vitro</i> de células tronco de blastocisto de símio após 11 dias de cultura sobre Matrigel.....	24
Figura 12: Esquema representativo da metodologia utilizada para as culturas de células da CNT de embriões de aves.....	29
Figura 13: Detecção dos principais fenótipos celulares da CNT sobre Matrigel.....	36
Figura 14: Efeito de diferentes lotes de Matrigel sobre a diferenciação de células da CNT.....	38
Figura 15: Efeitos do Matrigel sobre a condrogênese de células da CNT.....	41
Figura 16: Abordagem metodológica da criação de microambientes 2D e 3D para estudar a diferenciação de células da CNT.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes descritos da composição do Matrigel.....	20
Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para reações de imunofluorescência.....	32
Tabela 3: Quantidade estimada de melanócitos, células gliais e células musculares lisas observados em cultivos da CNT sobre o Matrigel.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CRISTA NEURAL.....	1
1.2 PROCESSO DE FORMAÇÃO DA CN.....	1
1.3 A REDE GÊNICA REGULATÓRIA DA CN.....	3
1.4 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN.....	4
1.5 FATORES QUE CONTROLAM A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN.....	4
1.6 METODOLOGIA PARA SEGUIR A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN.....	5
1.7 ROTAS MIGRATÓRIAS DAS CÉLULAS DA CN.....	8
1.8 FATORES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN.....	10
1.9 POTENCIALIDADE MESENQUIMAL DAS CÉLULAS DA CNT.....	14
1.10 ESTADO DA ARTE DAS METODOLOGIAS DE CULTURA DAS CÉLULAS DA CN.....	16
1.11 MATRIGEL: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADE.....	19
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES DE CODORNA.....	29
3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT DE AVES.....	29
3.3 CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CNT SOBRE MATRIGEL.....	30
3.4 IMUNOFLOUORESCÊNCIA PARA ANÁLISE DE DIVERSOS FENÓTIPOS DA CNT.....	31
3.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FENÓTIPOS.....	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33

4. RESULTADOS.....	35
4.1 ANÁLISE DO APARECIMENTO DE DIFERENTES FENÓTIPOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DA CNT SOBRE MATRIGEL.....	35
4.2 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE APARECIMENTO DE DIVERSOS FENÓTIPOS DA CN.....	37
4.3 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE CÉLULAS GLIAIS, MELANÓCITOS E CÉLULAS MUSCULARES LISAS DA CN POR POÇO.....	38
4.4 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE NEURÔNIOS E NÓDULOS DE CARTILAGEM POR POÇO.....	39
4.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO E A MORFOLOGIA DOS FENÓTIPOS CELULARES NOS MICROAMBIENTES 2D E 3D CRIADOS PELO MATRIGEL.....	41
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 A CRISTA NEURAL

Em 1868, o embriologista suíço Wilhelm His descreveu a presença de uma população de células entre o tubo neural e a futura epiderme nos embriões dos vertebrados (HIS, 1868). Segundo Wilhelm His, esse grupo de células originava gânglios craniais e espinhais nos embriões de galinha, e por esta razão as denominou como *Zwischenstrang* ou cordão intermediário.

Atualmente, esta estrutura é conhecida como Crista Neural (CN) e sabe-se que surge transitoriamente entre o ectoderma neural e a epiderme presuntiva no final da neurulação (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). A CN é formada por um conjunto de células multipotentes, as quais graças à sua alta capacidade migratória, têm a capacidade de colonizar vários sítios do embrião onde se diferenciam para dar origem a diversos tipos celulares (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

A aparição desta população celular nos vertebrados constituiu um dos acontecimentos mais importantes da evolução, uma vez que permitiu o desenvolvimento do crânio e dos processos maxilares e mandibulares (GANS; NORTH CUTT, 1983).

1.2 PROCESSO DE FORMAÇÃO DA CN

As células da CN se localizam na borda da Placa Neural (PN), isto é, no limite entre o ectoderme neural e epidermal (Fig. 1). A indução da formação desta estrutura começa quando os sinais que provêm da notocorda e do mesoderme subjacente promovem o espessamento do ectoderme que vai gerar a PN (Fig. 1) (GARCÍA-CASTRO, 2011). Esses fatores da família TGF β , os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e membros da família Wingless (Wnt), induzem a expressão de fatores de transcrição específicos da CN, como Snail1/2, Sox9, Sox10,

Pax3, Ap2, Msx1, Zic1 e Foxd3 (HARRIS; ERICKSON, 2007). Logo, as células da PN invaginam enquanto que as pregas neurais elevam-se uma em direção à outra e fusionam-se na região médio-dorsal para formar o tubo neural (TN) do embrião (GARCÍA-CASTRO, 2011) (Fig. 1).

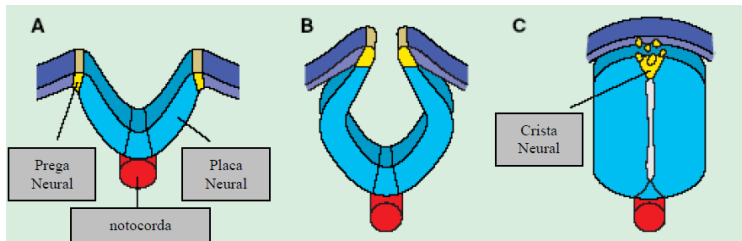


Figura 1: A formação da CN. Durante a neurulação, a placa neural dobra-se progressivamente para formar o tubo neural. As pregas neurais (em amarelo) formam-se na interface entre a placa neural (azul) e o ectoderma epidérmico (lilá). As pregas neurais unem-se progressivamente de maneira a formar o aspecto mais dorsal do tubo neural e a CN. Logo, as células da CN se desprendem das pregas neurais para migrar ao longo do corpo do embrião (Adaptado de Graham, 2003).

Em aves, o fechamento do TN acontece primeiramente na região anterior e progressivamente estende-se para a região caudal; já no embrião de camundongos, o TN inicialmente se fecha na região média da placa neural e estende-se para a região cranial e caudal do embrião (TRAINOR, 2005).

No caso das aves, as células da CN começam a migrar a partir do tubo neural assim que as pregas neurais se fusionam completamente (Fig. 1). Já, nos embriões de anfíbios, as células da CN migram a partir das pregas neurais que ainda continuam abertas; enquanto que no embrião de peixe, a migração ocorre a

partir de um engrossamento da união entre a epiderme e a PN (GARCÍA-CASTRO, 2011). Logo, essa migração das células da CN estende-se para todo o corpo do embrião por rotas bem definidas, até estas encontrar o seu nicho específico e se diferenciar em diversos tipos celulares (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010).

1.3 A REDE GÊNICA REGULATÓRIA DA CN

Durante os últimos anos, vários pesquisadores têm identificado uma série de genes envolvidos no processo de formação da CN (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004; STEVENTON; CARMONA-FONTAINE; MAYOR, 2005). Este conjunto de genes, junto com fatores de transcrição foi organizado numa rede regulatória gênica ou GRN (do inglês, *Gene Regulatory Network*) (Fig. 2) (HALL, 2009), a qual atua em três níveis principais de ação:

- Sinais indutivos da CN e fatores de transcrição *up-regulated* por esses sinais indutivos;
- Genes especificadores (tais como *snail*, *soxE*, *foxD3* e outras famílias) que especificam as células da CN e que são expressos antes da migração das células da CN;
- Genes efetores *downstream* associados à migração e a diferenciação das células da CN.

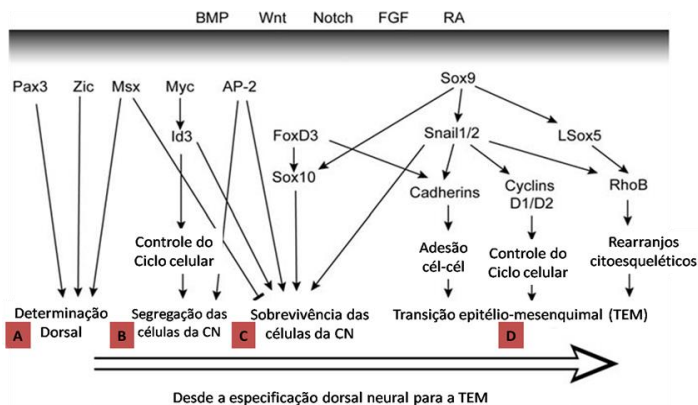


Figura 2: Esquema representativo dos genes e das vias de sinais que regulam o desenvolvimento das células da CN. O esquema está organizado em quatro passos: determinação do tubo neural dorsal (A), segregação das células da CN (B), sobrevivência das células da CN (C) e o processo de transição epitélio-mesenquimal (D) que leva à delaminação e posterior migração das células da CN. (Adaptado de MORALES *et al.*, 2005).

1.4 MIGRAÇÃO DAS CELULAS DA CN

A migração das células da CN acontece graças a um processo chamado Transição epitélio-mesenquimal (TEM) (HALL, 2009). Este processo abrange uma mudança na expressão de moléculas tais como as caderinas 6, caderina N e N-CAM (as quais por sua vez estão reguladas negativamente pelo fator de transcrição snail). Posteriormente, acontece um rearranjo da estrutura do citoesqueleto desencadeada pela expressão de moléculas como RhoB (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; TANEYHILL, 2008). Isto faz com que as células da CN percam aderência entre elas e assim possam se movimentar e descolar da lâmina basal do neuroepitélio.

1.5 FATORES QUE CONTROLAM A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

Graças à presença de diversos fatores de sinalização, fatores quimiotáticos e de moléculas da matriz extracelular (MEC) presentes no caminho de migração, as células da CN são orientadas espaço e temporalmente por rotas bem definidas no corpo do embrião (SELLECK; BRONNER-FRASER, 1995; ERICKSON; REEDY, 1998).

Cada caminho é moldado pela expressão de uma composição distinta de proteínas que tanto atraem quanto repelem a migração dessas células assim como pela expressão de integrinas ou efrinas nas células da CN que permite que estas também possam reconhecer e responder de forma específica a esses sinais (GAMMILL; ROFFERS-AGARWAL, 2010). Entre

as moléculas da matriz extracelular podem-se citar: os proteoglicanos sulfatados e as proteínas efrinas que inibem a migração; a fibronectina, laminina, tenascina e os colágenos tipo I e IV que favorecem a migração; e os colágenos tipos II, V e IX que são encontrados em regiões das quais as células da crista neural são excluídas, inibindo ou desviando o caminho dessas células (PERRIS; PERISSINOTTO, 2000).

Entretanto, existem propriedades intrínsecas a determinadas subpopulações de células da CN que as fazem apresentar comportamentos migratórios específicos. Por exemplo: alguns grupos celulares migram individual e progressivamente em forma de “gotejamento”, enquanto que outros grupos migram coletivamente e ao mesmo tempo formando lâminas de células. Isto permite (como neste último grupo celular), que as células da CN ainda permaneçam em comunicação durante o processo de migração (THEVENEAU; MAYOR, 2011).

1.6 METODOLOGIA PARA SEGUIR A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

No começo do século XX, vários pesquisadores desenvolveram diversas metodologias com o objetivo de poder estudar as populações da CN (JAIN; ANAND; SOOD, 2002). Os primeiros estudos procuravam marcar as células da CN de maneira de seguir os movimentos, seus padrões de migração e os tipos celulares derivados das células da CN. Por exemplo, uma das técnicas envolvia a ablação das pregas neurais, com o qual podia se determinar que tipo de tecido estava ausente e/ou defeituoso e ser atribuído à CN (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Outros experimentos consistiam em transplantar enxertos de várias partes do tubo neural entre diferentes espécies do embrião de anfíbios, nos quais as células diferiam em tamanho ou possuíam outras características para a identificação (HÖRSTADIUS, 1950). Com esses primeiros trabalhos, foi possível conhecer de modo geral como a CN contribui na

formação de derivados tais como melanócitos, estruturas craniofaciais e o sistema nervoso periférico (HALL, 2009).

Em 1969, Nicole Le Douarin observou uma característica muito interessante no núcleo interfásico de células de *Coturnix coturnix*: a cromatina era mais condensada comparado com a cromatina dos núcleos de células de galinha (Fig. 3A-B) (LE DOUARIN, 1969). Tirando proveito disso, o grupo de Nicole Le Douarin começou a realizar experimentos de enxertos de tecidos, implantando tecidos embrionários de codornas em embriões de galinhas (Fig. 3C). Este sistema de quimeras codorna-galinha consistia em retirar uma região particular do tubo neural da galinha antes da migração da CN e substituir pela mesma região do tubo neural no estado de desenvolvimento equivalente de um embrião de codorna (LE DOUARIN, 1969). Assim foi possível mapear as rotas de migração e o mapa de destino das células da CN de aves de forma mais precisa (Figs. 3D, 4, 5).

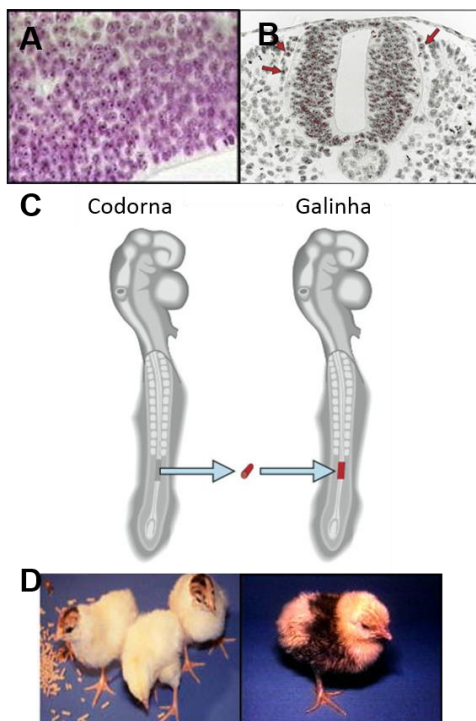


Figura 3: Sistema de quimeras galinha-codorna desenvolvido por Nicole Le Douarin. A. Os núcleos das células do tubo neural e da CN apresentam a cromatina mais densa (de codorna), em relação ao tecido hospedeiro (galinha), B. As setas indicam as células da CN migrando a partir do tubo neural, C. Substituição do tubo neural de galinha da região troncual no momento da migração das células da CN pela mesma região do tubo neural de um embrião de codorna, D. Exemplos de galinhas que tiveram diferentes regiões do tubo neural de codorna transplantada durante a fase embrionária, antes da migração das células da CN. Como a CN também dá origem as células pigmentares é possível identificar o nível em que o transplante de CN foi realizado, pela diferença na pigmentação. (Adaptado de Kuratani, 2009 e <http://www.sdbonline.org/archive/dbcinema/ledouarin/ledouarin.html>)

1.7 ROTAS MIGRATÓRIAS DAS CÉLULAS DA CN

As células da CN podem ser subdivididas funcionalmente em dois grupos principais (LE DOUARIN; ZILLER; COULY, 1993):

- As células da Crista Neural Cefálica (CNC), que emergem desde a região mais caudal do prosencéfalo e estendem-se até o limite entre o quarto e quinto par de somitos (Figs. 4A, 5).

- As células da Crista Neural Truncal (CNT), que emergem desde o limite entre o quarto e quinto par de somitos até a região mais posterior do tubo neural (Figs. 4B, 5).

A migração das células da CNC é subectodermal (Fig. 4A) e dá origem ao mesenquima crânio-facial, isto é, às estruturas maxilares e mandibulares (COULY *et al.*, 1996; KONTGES; LUMSDEN, 1996) (Fig. 5). As células da CNC provenientes dos últimos rombômeros (ao nível dos rombômeros 7 e 8) migram dorso-ventralmente em direção aos arcos e bolsas faríngeas e ao intestino primitivo anterior (mais precisamente à porta intestinal anterior, AIP – do inglês, *anterior intestinal portal*) gerando o sistema nervoso entérico (LE DOUARIN; TEILLET, 1973). Finalmente, outro grupo celular da CNC migra ao longo dos arcos aórticos, gerando parte do tubo cardíaco (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; ETCHEVERS *et al.*, 2001).

As células da CNT se movimentam em duas rotas principais, uma dorso-ventral e outra médio-lateral (RICKMANN; FAWCETT; KEYNES, 1985; LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999) (Fig. 4B). Na primeira rota, as células migram por entre o tubo neural e os somitos até alcançar a aorta dorsal para originar neurônios e células gliais dos gânglios simpáticos e células cromafins adrenais. As células da CN que passam pelo esclerótomo (sub-divisão do somito) formam neurônios sensoriais e gliais do gânglio da raiz dorsal e células de Schwann das raízes ventrais (TEILLET; KALCHEIM; LE DOUARIN, 1987; SERBEDZIJA; FRASER; BRONNER-FRASER, 1990; KASEMEIER-KULESA; KULESA;

LEFCORT, 2005;). Já as células que adotam uma rota dorsolateral, entre a derme e a epiderme, e se instalam sob o ectoderma, originam os melanócitos da pele (LE DOUARIN E KALCHEIM, 1999) (Fig. 4B).

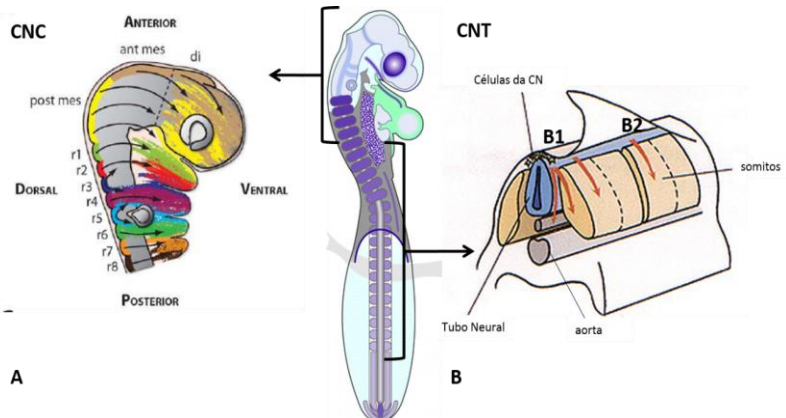


Figura 4: Rotas migratórias da CNC e da CNT. A) As células da CNC migram principalmente sobre camada subectodérmica e colonizam a massa naso-frontal e os arcos faríngeos conforme a altura em que se originam no embrião (setas) (Adaptado de Theveneau; Mayor, 2011). B) As células da CNT seguem duas rotas: B1, uma rota ventral por entre os somitos e por entre os somitos e o tubo neural, B2, ou uma rota dorsolateral, entre o dermomiótomo e a epiderme. (Adaptado de <http://www.kinderchirurgie.ch/handbuch/abdomen/hirschsprung.html>). R, rombencéfalo; ant mes, mesencéfalo anterior; di, diencéfalo.

A partir do conhecimento mais preciso das rotas de migração foi possível também criar o mapa de destino das células de cada região da CN (LE DOUARIN *et al.*, 2004) (Fig. 5).

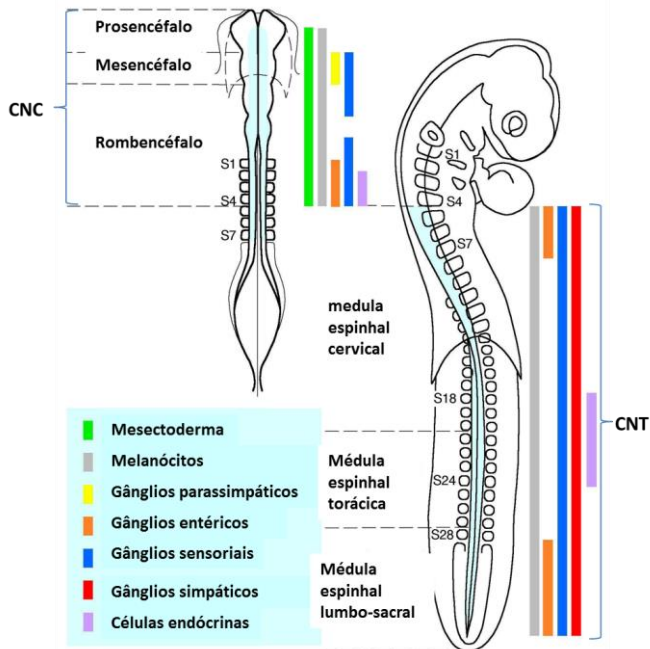


Figura 5: Mapa de destino das células da CN. O mapa de destino evidencia que alguns dos tipos celulares derivam praticamente de todos os níveis, como os melanócitos, que são gerados por células ao longo de todo o eixo antero-posterior do embrião (linha cinza). Enquanto outros estão restritos a uma pequena área, como a cartilagem e o osso que exclusivamente derivam da região cefálica (linha verde) (adaptado de Le Douarin *et al.*, 2004).

1.8 FATORES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

Muitas das moléculas sinalizadoras que as células da CN vão encontrando no seu caminho migratório (matriz extracelular e/ou diversos fatores que são secretados pelo ectoderma, endoderma, mesoderma, notocorda e a própria CN) têm a capacidade de influenciar na escolha do destino celular.

Entretanto, esses fatores podem guiar na determinação do fenótipo das células da CN, desde que as mesmas possuam os receptores específicos que respondam a esses sinais (SELLECK; BRONNER-FRASER, 1995; ERICKSON; REEDY, 1998).

Por exemplo, o morfógeno sonic hedgehog (Shh) favorece o aparecimento dos progenitores com potencialidade mesenquimal e neural e também promove a diferenciação condrogênica (CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). O fator de células tronco (SCF) atua como fator de sobrevivência e, junto com fator de crescimento nervoso (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e endotelina 3 (ET3) promove a proliferação e diferenciação de progenitores melanocíticos e gliais (SIEBER-BLUM, 1998).

O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) dependendo do contexto promove a geração de células musculares lisas, neurônios autônomos ou a apoptose (SHAH; GROVES; ANDERSON, 1996; HAGEDORN; SUTER; SOMMER, 1999). Wnt atua na via intracelular que envolve β -catenina guiando às células da CN para que adotem o destino sensorial à expensas dos outros destinos celulares (HARI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004). BMP2 promove a diferenciação das células da CN como neurônios autônomos às expensas do destino glial. Por outro lado, a Neuregulina 1 e a ativação do receptor de Notch mediado por Delta leva à aquisição do fenótipo glial (SHAH GROVES; ANDERSON, 1996; MORRISON *et al.*, 2000).

A diferenciação melanocítica a partir das células da CN está regulada principalmente pelo peptídeo ET3 (além do seu papel na neurogênese entérica) (DUPIN, 2011). Durante os estágios mais precoces, a ET3 produz um efeito mitogênico nas células da CN em cultura e, nas culturas clonais, a ET3 promove a proliferação, sobrevivência e auto-renovação de progenitores bipotentes (glia-melanócito) (DUPIN *et al.*, 2003). O estímulo da melanogênese resulta da mudança na expressão do receptor

ETRB pelo receptor ETRB2 nas células da CN de codornas (LAHAV *et al.*, 1998).

A descoberta do amplo repertório de derivados celulares da CN despertou o interesse por novos estudos a respeito dos efeitos exercidos pelas moléculas e/ou fatores sinalizadores sobre o destino celular. Desta forma, surgiram novas e importantes questões relacionadas à ontogenia e a diferenciação das células da CN. Por exemplo, os fatores de sinalização estariam atuando sobre toda a população celular da CN ou sobre alguns tipos específicos de células? Esses fatores atuariam de maneira instrutiva guiando as células indiferenciadas da CN para destinos específicos ou de forma permissiva, promovendo a sobrevivência de progenitores específicos da CN?

Para responder a essas questões foi preciso desenvolver técnicas *in vitro* que permitissem revelar os mecanismos de determinação do destino das células da CN. Um primeiro passo foi começar a estudar grupos de populações de células da CN, onde um conjunto de células da CN eram isoladas uma vez que migravam a partir de explantes de tubos neurais sobre placas de cultura (culturas de massa). Logo passou-se também a analisar-se individualmente o comportamento das células da CN com o fim de conhecer a progênie fenotípica à qual uma célula da CN pode dar origem (metodologia conhecida como cultura clonal, desenvolvida por Cohen e Königsberg em 1975, Fig. 6).

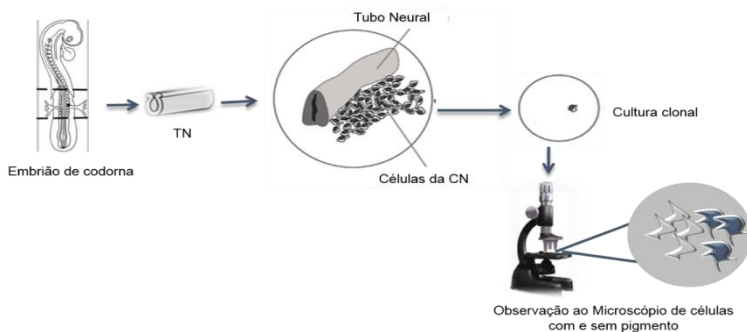


Figura 6: Metodologia de cultura clonal desenvolvida por Cohen e Königsberg (1975). Primeiramente era retirado um segmento do tubo neural (TN) de embriões de codorna e colocados numa placa de cultura para que células da CN migrem na placa de cultura. A partir desta população de células, era isolada uma única célula e colocada sobre placas de cultura. Após alguns dias, eles observavam no microscópio dois grupos celulares: células com pigmento e sem pigmento.

Na década de 1980, o grupo da Dra. Nicole Le Douarin adaptou estas metodologias, implementando também o uso de monocamadas de fibroblastos embrionários de camundongos (3T3) com o objetivo de avaliar a sobrevivência e a diferenciação das células da CN *in vitro* (BAROFFIO; DUPIN; LE DOUARIN, 1988). Graças a esses avanços, nos últimos vinte anos conseguiu-se obter informações principalmente sobre os derivados neurais e pigmentares das células da CNT, assim como da presença de progenitores multipotentes nas populações celulares iniciais da CNT e CNC dos embriões de aves (BAROFFIO; DUPIN; LE DOUARIN, 1988; DUPIN *et al.*, 1990; BAROFFIO; DUPIN; LE DOUARIN, 1991; TRENTIN *et al.*, 2004; DUPIN *et al.*, 2007; CALLONI *et al.*, 2007; LE DOUARIN *et al.*, 2008; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009; DUPIN *et al.*, 2010).

1.9 POTENCIALIDADE MESENQUIMAL DAS CÉLULAS DA CNT

Classicamente está bem estabelecido que as células da CNT em geral não são capazes de originar tecidos mesenquimais *in vivo*. Neste caso, os tecidos mesenquimais do tronco são inteiramente derivados do tecido mesodermal (Le Douarin; Kalcheim, 1999). Uma exceção a isto constitui o endoneuro (o tecido que reveste os nervos), o qual é composto de células musculares lisas derivadas da CNT (JOSEPH *et al.*, 2004).

Entretanto, existem diversos trabalhos que demonstram que, sob determinadas condições de cultivo, as células da CNT são capazes de originar diversos fenótipos mesenquimais (MCGONNELL; GRAHAM, 2002; ABZHANOV *et al.*, 2003; IDO; ITO, 2006; BILLON *et al.*, 2007; CALLONI *et al.*, 2007).

Por exemplo, vários trabalhos têm demonstrado a presença de células musculares lisas nas culturas de massa e clonais da CNT de aves (SIEBER-BLUM; ITO, 1995; TRENTIN *et al.*, 2004) e de camundongos (SHAH *et al.*, 1994; HAGEDORN; SUTER; SOMMER, 1999; SIEBER-BLUM *et al.*, 2004).

No ano de 2002, McGonnell e Graham (2002) demonstraram pela primeira vez que as células da CNT de aves podem dar origem a condrócitos e osteoblastos quando cultivadas em meios de cultura contendo dexametasona, ácido ascórbico e b-glicerofosfato (compostos comumente utilizados para estimular a diferenciação condrogênica e osteogênica) (MCGONNELL; GRAHAM, 2002). Além disso, sob condições apropriadas de cultivo a CNT de codornas é capaz de originar adipócitos (BILLON *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi demonstrado que a exposição das células da CNT com o morfógeno Shh aumenta a frequência de poços de cultivo contendo nódulos de cartilagem (CALLONI *et al.*, 2007). Além disso, em ensaios clonais, foi detectado pela primeira vez um progenitor multipotente da CNT

capaz de produzir células gliais, células musculares lisas e condrócitos (CALLONI *et al.*, 2007).

Todas essas evidências sugerem que o potencial mesenquimal da CNT em organismos amnióticos pode ser revelado sob condições específicas de cultivo *in vitro* (Fig. 7). Também pode-se considerar que possivelmente os fenótipos mesenquimais da CN não surgiram a partir de precursores independentes na CNT e na CNC. Entretanto, este novo e único progenitor (GFC) da CNT com potencialidade neural-mesenquimal foi observado somente em um único clone dos 450 que foram analisados (Calloni *et al.*, 2007), o que deixa claro que torna-se imprescindível estabelecer novas condições de cultura celular que permitam continuar com os estudos clonais da CNT.

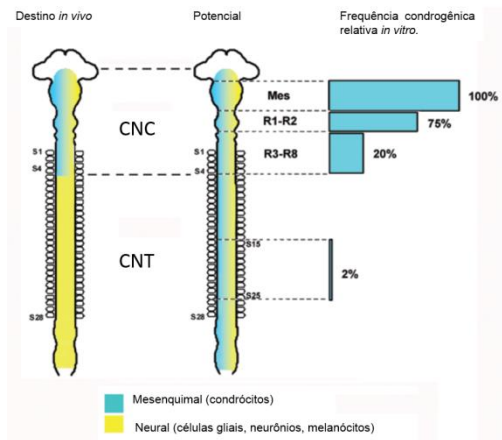


Figura 7: Comparação do mapa de destino e do mapa de potencialidades das células da CN. Segundo a sua origem cefalo-caudal, podemos verificar a capacidade de gerar fenótipos neurais (em amarelo) e/ou mesenquimais (em azul) pela CN. Sabe-se que somente a CNC pode dar origem a fenótipos mesenquimais *in vivo*, no entanto em certas condições *in vitro* a CNT também pode originar esses fenótipos. Também está representada a frequência de aparecimento do fenótipo condrogênico, a qual vai diminuindo a partir do mesencéfalo (mes) para a região mais caudal (do R3 para o R8) (R, rombômero; S, somito). (Adaptado de Le Douarin *et al.*, 2008).

1.10 ESTADO DA ARTE DAS METODOLOGIAS DE CULTURA DAS CÉLULAS DA CN.

Até hoje, a maior parte das culturas de células da CN foram realizadas utilizando substratos bidimensionais, tais como superfícies de plástico ou placas de cultura cobertas com moléculas da matriz extracelular (fibronectina, colágeno, etc.) (BAROFFIO; DUPIN; LE DOUARIN, 1988, 1991; ITO *et al.*, 1993; TRENTIN *et al.*, 2004; COSTA-SILVA *et al.*, 2009). Outro tipo de arcabouço bidimensional utilizado são as monocamadas alimentadoras de fibroblastos embrionários (3T3). Essas monocamadas são capazes de permitir o aparecimento da maioria dos fenótipos da CN, especialmente neurônios e condrócitos (CALLONI *et al.*, 2007, 2009), que correspondem aos tipos celulares mais difíceis de serem obtidos a partir de culturas de células indiferenciadas da CN (DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010).

Entretanto, a aplicação das monocamadas de 3T3 apresenta uma série de desvantagens durante a experimentação com células da CN tais como: são difíceis de manipular rotineiramente e o isolamento e a purificação das células da CN das placas de cultura sobre o 3T3 é extremamente complexo e laborioso. Este último aspecto dificulta ainda mais a sua utilização nas culturas de larga escala, por exemplo, em sub-clonagens (THOMSON *et al.*, 1998; REUBINOFF *et al.*, 2000; HEINS *et al.*, 2004; TRENTIN *et al.*, 2004; BIGDELI *et al.*, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2013). Outro dos inconvenientes é a presença de fatores de crescimento que são secretados pelos fibroblastos da monocamada alimentadora 3T3, o que impede um total controle dos processos e mecanismos que acontecem durante a diferenciação e auto-renovação das células da CN.

Ainda, deve ser considerado o fato de que o 3T3 constitui um tipo de arcabouço bidimensional (2D) e, hoje em dia, sabe-se que este tipo de microambiente possui uma dinâmica e uma estrutura muito diferente daquela que é encontrada no ambiente

tridimensional (3D), por exemplo, nos tecidos *in vivo* (BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005). Embora, a maior parte dos trabalhos de cultivo celular foram e são realizados sobre microambientes 2D, alguns trabalhos vem demonstrado que o comportamento das células que são cultivadas em um ambiente 2D não reflete exatamente o comportamento que estas teriam em um ambiente 3D (TANAKA *et al.*, 2004; TIBBITT; ANSETH, 2009; LUTOLF; GILBERT; BLAU, 2009).

Em parte, isto acontece porque no ambiente 2D a célula apresenta uma morfologia aplanada e polarizada no qual somente uma parte dela interage com o substrato ou com as células vizinhas (Fig. 8). Neste tipo de ambiente, as células recebem os nutrientes em concentrações homogêneas, o que não é encontrado no ambiente *in vivo* (BIRGERDOSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005; KRAEHENBUEHL; LANGER; FERREIRA, 2011). Pelo contrário, quando as células são cultivadas em um ambiente 3D, estas apresentam uma morfologia mais estendida, as adesões focais tendem a se distribuir em todas as dimensões e os nutrientes se distribuem em forma de gradientes de concentração (Fig. 8) (BAKER; CHEN, 2012).

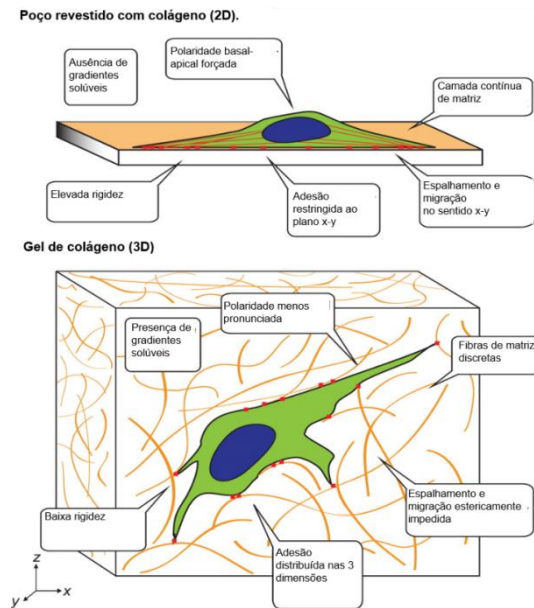


Figura 8: Esquema representativo dos aspectos que afetam as células cultivadas em superfícies 2D e 3D. As células que são cultivadas sobre monocamadas ou camadas finas de moléculas da matriz extracelular (colágeno 2D) apresentam uma morfologia achatada e podem-se aderir e espalhar livremente num plano horizontal, sem possibilidade de se espalhar no plano vertical. Por esta razão, no microambiente 2D, as células são forçadas a ter uma polaridade apical-basal. Além disso, contrário ao que ocorre no ambiente 3D, a rigidez resulta maior no colágeno 2D e os fatores solúveis não conseguem se distribuir em gradientes. Pelo contrário, as células cultivadas sobre ambientes 3D (gel de colágeno) podem se espalhar nas três dimensões e apresentam uma polaridade menos pronunciada (Adaptado de Baker; Chen, 2012).

Hoje em dia existem diversos tipos de metodologias alternativas que buscam substituir o uso de monocamadas nas culturas celulares. Uma destas alternativas constitui a utilização de uma membrana basal de matriz reconstituída comercialmente conhecida como Matrigel.

1.11 MATRIGEL: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

O Matrigel constitui uma mistura solúvel de proteínas extraídas e purificadas da membrana basal reconstituída de um condro-sarcoma (EHS – Engelbreth-Holm-Swarm) de camundongos, também conhecida como extrato EHS, RBM (do inglês, *reconstituted basement membrane*) ou simplesmente Matrigel (ORKIN *et al.*, 1977; KLEINMAN; MARTIN, 2005). Em temperatura ambiente, as proteínas solúveis do Matrigel polimerizam-se e formam uma matriz em forma de gel que é biologicamente ativa e a qual se assemelha à membrana basal presente nos animais devido à sua estrutura tridimensional (KLEINMAN; MARTIN, 2005; THONHOFF *et al.*, 2008). O Matrigel constitui um material biodegradável e não tóxico. Portanto, estas características fazem do Matrigel uma boa alternativa para estudar o crescimento, a morfogênese e a diferenciação de células *in vitro* (KLEINMAN; MARTIN, 2005).

Este gel tridimensional possui na sua composição moléculas da matriz extracelular, fatores de crescimento (VUKICEVIC *et al.*, 1992) e outros fatores (Tabela 1), muitos dos quais ainda não foram identificados.

Tabela 1: Componentes descritos da composição do Matrigel.**COMPONENTES DO MATRIGEL****COMPONENTES ABUNDANTES**

Laminina (Kleinman *et al.*, 1982; Vukicevic, *et al.*, 1992; Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Colágeno tipo IV (Kleinman *et al.*, 1982; Vukicevic, *et al.*, 1992; Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Perlecana (sulfato de heparan) (Hassell *et al.*, 1980; Kleinman *et al.*, 1982; Vukicevic *et al.*, 1992)

Entactina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010; Vukicevic *et al.*, 1992)

PROTEASES

92 kda Mmp-9 (Mackay *et al.*, 1993)

72 kda Mmp-2 (Mackay *et al.*, 1993)

Urokinase (Ativador do plasminogênio tecidual) (Mackay *et al.*, 1993)

FATORES DE CRESCIMENTO

TGFB (Vukicevic, *et al.*, 1992)

EGF (Vukicevic, *et al.*, 1992)

IGF (Vukicevic, *et al.*, 1992)

NGF (Vukicevic, *et al.*, 1992)

PDGF (Vukicevic, *et al.*, 1992)

CTGF (Factor de crescimento de tecido conjuntivo) (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

FGF (Vukicevic, *et al.*, 1992)

KLF (*Kruppel-like fator 6/15*) (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

OUTRAS PROTEINAS

Dineina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Miosina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Chaperonas (HSP) (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Transferrina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Fibronectina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Amilase (Kleinman; Martin, 2005)

Clusterina (Kleinman; Martin, 2005)

Fibrinogênio (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Desmina (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

Adenilato cinase (Hughes; Postovit; Lajoie, 2010)

As primeiras aplicações deste arcabouço foram realizadas com o intuito de explorar o papel do Matrigel na adesão, morfogênese e a diferenciação de diversos tipos celulares (KLEINMAN; MARTIN, 2005). Inicialmente, este arcabouço foi utilizado para estudar o cultivo primário de células de Sertoli (HADLEY *et al.*, 1985). Neste experimento observou-se que as células de Sertoli se transformavam em células altamente polarizadas e se organizavam em epitélios colunares. As células germinais que acompanhavam as células de Sertoli sobreviviam e começavam a se diferenciar (contrariamente ao que era observado quando estas células eram cultivadas sobre plástico ou colágeno I) (HADLEY *et al.*, 1985). Estas estruturas, que assemelhavam à organização tecidual original, podiam ser transplantadas nos animais, onde novamente as células germinativas cresciam e se diferenciavam originando células espermáticas (HADLEY *et al.*, 1985). Outro trabalho pioneiro do uso do Matrigel constitui o realizado por Kleinman e colaboradores (1986), que demonstraram que as células de melanoma B16C3 produziam mais pigmento e mudavam a sua morfologia quando eram cultivadas sobre Matrigel quando comparado com o controle sobre plástico (Fig. 9) (KLEINMAN *et al.*, 1986).

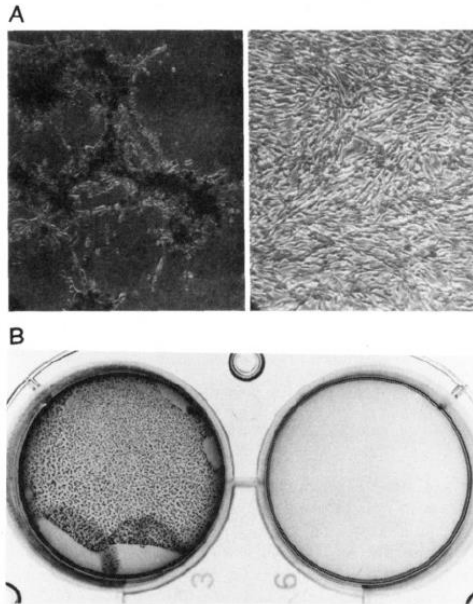


Figura 9: Crescimento de células de melanoma B16C3 sobre Matrigel versus controle. As imagens representam culturas de células de melanoma B16C3 de uma semana sobre Matrigel (esquerda) ou sobre plástico (direita). A) Imagens mostrando a morfologia e a melanogênese destas células. B) Vista dos poços de cultura mostrando a quantidade de melanogênese observada para cada condição. (Retirada de Kleinman *et al.*, 1986).

Outros estudos já demonstraram que o Matrigel tem a capacidade de permitir a diferenciação *in vitro* das células de Schwann (CAREY; TODD; RAFFERTY, 1986) e de neurônios (UEMURA *et al.*, 2010). Quanto a tipos celulares mesenquimais, experimentos mostram que o Matrigel é eficiente em permitir a formação de nódulos de cartilagem a partir de condrócitos (BRADHAM; PASSANITI; HORTON, 1995). Em 2001, Asakura e colaboradores demonstraram que células tronco obtidas de fibras musculares adultas podem dar origem a

miócitos, osteoblastos e adipócitos quando colocadas sobre o Matrigel (ASAKURA; KOMAKI; RUDNICKI, 2001).

Curiosamente, uma das primeiras aplicações do Matrigel fora do NIH (do inglês, *National Institutes of Health*) onde foi desenvolvido, foi justamente o cultivo de explantes de tubos neurais da região do tronco de embriões de galinha para a observação da migração das células da crista neural. Neste estudo, Bilozur e Hay observaram que as células da CN crescem extensivamente sobre o Matrigel (Fig. 10) (BILOZUR; HAY, 1988).

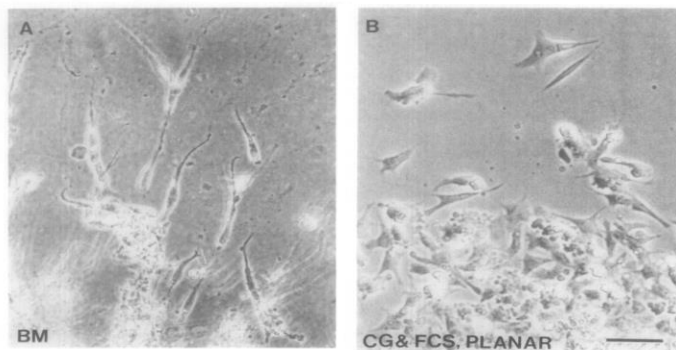


Figura 10: Imagens ilustrativas da migração das células da CN num ambiente 3D e um ambiente plano. A) Sobre o Matrigel, as células da CN apresentam uma clara morfologia alongada. B) Sobre colágeno, as células da CN apresentam uma morfologia mais achatada e espalhada. BM, Basement membrane, CG & FCS, Colágeno e fatores de crescimento. (Retirada de BILOZUR E HAY, 1988)

Foi precisamente a partir deste trabalho que o Matrigel começou a ser utilizado na cultura de diversos tipos de células tronco embrionárias indiferenciadas.

Um dos primeiros trabalhos a demonstrar que as células tronco embrionárias podem ser cultivadas sobre Matrigel sem necessidade de utilizar monocamadas foi o trabalho de Xu e colaboradores (2001), eles observaram que estas células

mantinham-se indiferenciadas depois de 130 passagens de cultura (XU *et al.*, 2001). Em 2005, Philp e colegas reportaram que células tronco de blastocisto de símios formam estruturas glandulares quando cultivadas sobre Matrigel (Fig. 11) (PHILP *et al.*, 2005). Mais recentemente, Bell e colaboradores demonstraram que as células tronco dermais (de origem da CN) são capazes de se diferenciar em células endoteliais e de formar estruturas de tipo tubulares ou capilares quando cultivadas sobre Matrigel (BELL *et al.*, 2012). Nesse sentido, sabe-se que a membrana basal constitui a primeira matriz extracelular com a qual as células tronco têm contato durante o desenvolvimento embrionário, portanto, é bem provável que matrizes como o Matrigel afetem a diferenciação destas células (KLEINMAN; MARTIN, 2005). Interessantemente, Yao *et al.* (2006) reportaram que o Matrigel permite a auto-renovação a longo prazo de células tronco embrionárias humanas (YAO *et al.*, 2006).

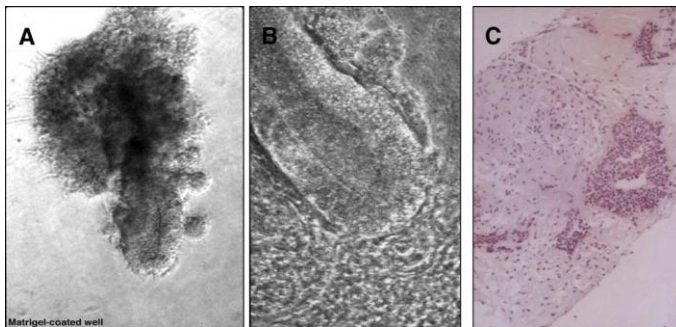


Figura 11: Diferenciação *in vitro* de células tronco de blastocisto de símio após 11 dias de cultura sobre Matrigel. A) Aspecto das colônias de células tronco formando clusters com células especializadas. B) Imagem do mesmo tipo celular formando estruturas de tipo túbulo-glandular. C) Imagem de um corte histológico mostrando a formação de um lúmen do tipo epitelial. (Retirada de PHILP *et al.*, 2005).

Devido ao fato de que as células tronco embrionárias requerem rotineiramente o emprego de monocamadas de fibroblastos 3T3 para sua cultura, a aplicação do Matrigel representou um importante avanço na cultura destas células tronco graças à capacidade deste arcabouço em manter a pluripotencialidade e em permitir a auto-renovação. Desta forma, o emprego do Matrigel como arcabouço de cultivo permitiu simplificar a manipulação destes tipos celulares *in vitro*.

Em 1987, Maxwell e Forbes reportaram o primeiro estudo da diferenciação das células da CN cultivadas sobre Matrigel. Eles observaram que o Matrigel permite o aparecimento de células pigmentadas e detectaram um incremento de neurônios adrenérgicos nas culturas de células da CNT (MAXWELL; FORBES, 1987, 1990a). Posteriormente, os mesmos pesquisadores demonstraram que existia também um incremento de células positivas para tirosina hidroxilase (TH) e somatostatina, nas culturas da CNT sobre o Matrigel (MAXWELL; FORBES, 1990b). Isto demonstra a compatibilidade das células da CN com o Matrigel.

Tal como foi descrito anteriormente, a CNT pode originar uma gama de fenótipos maior do que a conhecida na época em que estes trabalhos foram executados. Por exemplo, a CNT pode dar origem, *in vitro*, tanto a derivados neurais e melanocíticos quanto a derivados mesenquimais (células musculares lisas, adipócitos, condrócitos e osteoblastos). Desta forma, surge a pergunta e principal objetivo do presente trabalho: o Matrigel seria capaz de permitir ou estimular o desenvolvimento de ambas as potencialidades da CNT (neural e mesenquimal)? Em caso afirmativo, o emprego do Matrigel poderia substituir os atuais substratos utilizados para o cultivo das células multipotentes da CN. Se isto fosse possível, também seria interessante abordar os estudos que ficam latentes sobre auto-renovação e multipotencialidade dos progenitores da CN.

É importante destacar que, atualmente várias destas questões ainda não puderam ser respondidas devido às

dificuldades experimentais associadas aos substratos utilizados até o momento, tais como o uso do 3T3 ou de moléculas de superfície como laminina, fibronectina e colágeno. Até o momento, o uso do 3T3 é praticamente obrigatório devido a que esta monocamada permite o desenvolvimento do amplo conjunto de fenótipos que uma célula da CN pode dar origem. Entretanto, o isolamento e a purificação das células da CN cultivadas sobre 3T3 é extremamente difícil e laborioso. Por esta razão, o estudo da auto-renovação da CN mediante sub-clonagens deve ser realizado sobre superfícies revestidas de colágeno, as quais por sua vez não permitem a diferenciação e a consequente obtenção de derivados condrogênicos e de neurônios.

Desta forma, o presente trabalho apresenta um estudo da aplicação do Matrigel como alternativa à metodologia de cultura de células da CN sobre as monocamadas de 3T3 e outros substratos do tipo 2D. Entretanto, surge um inconveniente no uso do Matrigel como substrato nas culturas celulares que é a existência de variações entre os diferentes lotes do material (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003). Por esta razão, no presente trabalho objetivou-se verificar se existem diferenças na capacidade de diferenciação da CN sobre lotes distintos de Matrigel. Em caso afirmativo, procurou-se saber quão grande seriam estas diferenças. Além disso, tentou-se normalizar as possíveis variações porventura existentes entre os lotes analisando o efeito de uma mistura dos lotes na diferenciação das células da CN.

O presente trabalho vislumbrou ainda um novo sistema de cultivo das células da CN, recriando em um mesmo poço de cultura dois microambientes distintos: um bidimensional e outro tridimensional. O objetivo neste caso foi o de verificar se as células da CN apresentariam diferenças quanto a ocorrência, distribuição, morfologia e capacidade de diferenciação neste dois microambientes distintos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar a potencialidade de diferenciação das células da crista neural truncal sobre distintos lotes e uma mistura de lotes de Matrigel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar o aparecimento dos principais fenótipos da CNT pela expressão de marcadores específicos para células gliais, neurônios, melanócitos, células musculares lisas e condrócitos nas culturas de células da CNT sobre distintos lotes ou uma mistura de lotes de Matrigel.
- Investigar a influência dos microambientes 2D e 3D (formados no mesmo poço revestido com Matrigel) sobre a morfologia e a distribuição dos tipos celulares obtidos nas culturas da CNT.
- Analisar a frequência de aparecimento destes fenótipos em culturas de células da CNT sobre distintos lotes ou uma mistura de lotes de Matrigel.
- Estimar o número de células gliais, melanócitos e células musculares lisas por poço nas culturas de células da CNT sobre distintos lotes ou uma mistura de lotes de Matrigel.
- Quantificar o número de neurônios e de nódulos de cartilagem por poço nas culturas de células da CNT sobre distintos lotes ou uma mistura de lotes de Matrigel.

3. METODOLOGIA

Os principais passos e etapas da metodologia realizadas neste trabalho estão mostradas no esquema abaixo:

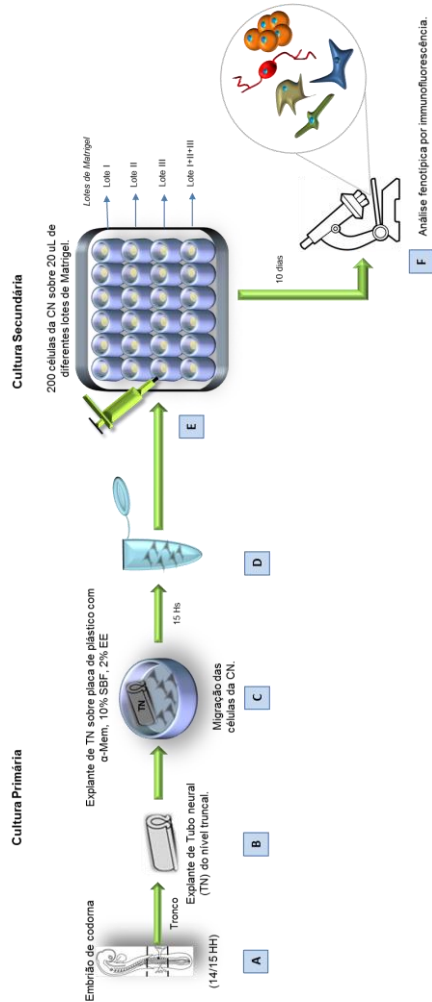


Figura 12: Esquema representativo da metodologia utilizada para as culturas de células da CNT de embriões de codornas. (A) Os tubos neurais do nível truncal foram dissecados a partir de embriões de codorna no estágio de 20 a 25 somitos (B). Esses tubos neurais (TN) eram submetidos a uma digestão enzimática e uma microcirurgia e plaqueados em placas de 35 mm. Após 15 h de migração (C), as células da CNT eram coletadas (D) e plaqueadas em placas de cultura revestidas previamente com três lotes diferentes de Matrigel (lotes I, II e III) ou uma mistura deles (I+II+III) (E). Após 10 dias de cultura, os fenótipos das células eram analisados mediante imunofluorescência (F). HH, Hamburger e Hamilton.

3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES DE CODORNA.

Todo o trabalho experimental foi realizado com embriões de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) de ovos fecundados obtidos no biotério do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os procedimentos estão aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA) (Processo cadastrado sob o número: PP00493). Para a obtenção de células da CNT, foram utilizados embriões nos estádios de desenvolvimento entre 20 a 24 somitos (estádios 14/15, segundo HAMBURGUER; HAMILTON, 1951) (Fig. 12A). Os ovos foram incubados por 48 horas a 37,8°C em incubadora com umidade relativa de 65%.

3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA CNT DE AVES.

Para as culturas primárias de células da CNT, foram isolados explantes de tubos neurais dissecados da região truncal correspondente aos últimos 10 pares de somitos de embriões de codorna com 20 a 24 pares de somitos no estágio já mencionado (Fig. 12B). Em seguida, o tubo neural foi dissecado para retirar os tecidos circundantes na presença de pancreatina diluída (6,25g/L, Invitrogen) em meio *α -modified minimum essential* (α -MEM)

na proporção de 25% de pancreatina e 75% de meio de cultura. Este procedimento microcirúrgico foi realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus) e de agulhas entomológicas de tungstênio. Após a dissecação, os explantes de tubo neural foram retirados da solução de pancreatina e passados para outro recipiente contendo meio de cultura α -MEM com 10% de soro bovino fetal (SBF, Vitrocell), para bloquear a ação da pancreatina.

Em seguida os explantes de tubo neural foram cuidadosamente colocados em placas de cultura de plástico de 35 mm (Corning) em meio α -MEM contendo 10% de SBF e 2% de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/mL, Gibco) e estreptomicina (10 μ g/mL, Gibco). Os explantes foram mantidos em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Este procedimento permite, após 15 horas de cultura, a migração das células da CN a partir dos explantes dos tubos neurais (Fig. 12C).

3.3 CULTURA SECUNDÁRIA DE CÉLULAS DA CNT SOBRE MATRIGEL.

Após essas 15 horas, os explantes de tubo neural foram removidos e descartados e as células da CN que migravam foram descoladas com uma solução de tripsina 0,05% (Sigma). Após 2-3 minutos, a ação da tripsina foi interrompida através da utilização de meio de cultivo contendo 10% de SBF. As células foram então recuperadas e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos (Fig. 12D).

Em seguida, as células da CNT foram ressuspensas e semeadas em gotas de 20 μ l contendo aproximadamente 200 células por poço, em placas de 96 poços previamente revestidas com uma membrana basal de matriz comercialmente conhecida como Matrigel™ (BD, Biosciences) (Fig. 12E).

Para o revestimento das placas de cultura com Matrigel, o gel era descongelado previamente sobre o gelo (para permitir um descongelamento lento e evitar a sua polimerização no

momento da manipulação). Os poços das placas de cultura foram revestidos com um gel fino de 20 μ l de volume do arcabouço utilizando ponteiras mantidas em freezer (-20°C) por 12 horas, conforme instruções do fabricante. O Matrigel polimeriza-se colocando-se a placa de cultivo na estufa CO₂ a 37°C durante no mínimo 30 minutos.

Devido ao Matrigel apresentar variações nos fatores de crescimento e de moléculas de matriz extracelular entre os lotes, nós decidimos comparar a diferenciação das células da CN em três lotes diferentes (referidos como lotes I, II e III). Além disso, com o objetivo de normalizar as possíveis discrepâncias que poderíamos encontrar devido a esta variabilidade entre os lotes, misturamos estes três lotes em volumes iguais (referido como lote I+II+III), totalizando os mesmos 20 μ l finais (Fig. 12E).

As culturas de massa foram mantidas por 10 dias em meio de cultura α -MEM contendo 10% de SBF e 2% de EE, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ com trocas de meio a cada três dias durante o período de cultivo.

3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISE DE DIVERSOS FENÓTIPOS DA CNT.

Após os 10 dias de cultura secundária, as células da CNT foram fixadas com 4% paraformaldeído por 40 minutos e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta (Fig. 12F).

Para as reações por imunofluorescência indireta, as células foram incubadas por 30 minutos com solução de PBS-Triton X-100 (0,25%, Sigma) com a finalidade de permeabilizar os poros na membrana celular para que os anticorpos penetrassem na célula. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SBF diluído em PBS durante 40 minutos.

Por fim, as células foram incubadas por 12 horas à 4°C com os diversos anticorpos primários específicos para os diferentes fenótipos que a CN pode originar descritos na tabela abaixo:

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para reações de imunofluorescência.

Anticorpo I°	Tipo celular	Tipo/Origem	Subtipo
<i>anti-HNK1</i>	Células Gliais	Monoclonal /camundongo	IgM
<i>anti-β tubulina III</i>	Neurônios	Monoclonal/camundongo	IgG1
<i>anti-MelEM</i>	Melanoblastos	Monoclonal /camundongo	IgG1
<i>anti-SMA</i>	Célula muscular lisa	Monoclonal/camundongo	IgG2a
<i>anti-sulfato de condroitina</i>	Condrócitos	Monoclonal/camundongo	IgM

Após a marcação com os supracitados anticorpos primários, as células foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) (Sigma) por 15 minutos, e subsequentemente incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários (Tx RED, FITC obtidos de Southern Biotechnology Associates).

Os núcleos das células foram marcados com o corante fluorescente nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido – DAPI (1mg/ml; Sigma) e visualizados sob luz ultravioleta. As marcações fluorescentes da expressão fenotípica dos derivados da CN foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus IX71 com câmera Olympus DP71.

3.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FENÓTIPOS

Primeiramente, foi quantificado o número de poços nos quais aparecia cada um dos fenótipos (segundo o tipo de lote ou a mistura de lotes de Matrigel utilizado). A partir deste dado, o valor foi convertido a porcentagem e analisado estatisticamente

para detectar as diferenças significativas na frequência de aparecimento dos fenótipos.

Além disso, no presente trabalho foi analisado a quantidade de cada um dos fenótipos observados nas culturas de células da CNT sobre os diferentes tipos de lotes de Matrigel em cada poço individualmente.

No caso das células gliais, células musculares lisas e melanócitos, estes tipos celulares geralmente formam populações muito densas nas culturas de células da CN. Esse fato dificulta a contagem direta das células individuais. Por esta razão, foi estimada a quantidade destas células por poço classificando o aparecimento dos fenótipos em quatro grupos principais como segue: pequeno (25%), médio (50%), grande (75%) e muito grande (100%).

Em comparação com os fenótipos anteriores, os nódulos de cartilagem e neurônios são relativamente mais fáceis de serem quantificados. A cartilagem aparece formando nódulos facilmente identificáveis inclusive na microscopia de contraste de fase. Estes nódulos contêm centenas de condrócitos (proporcional ao tamanho dos nódulos). Por esta razão, quantificamos o número de nódulos de cartilagem, mas não o de condrócitos individuais.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Em um primeiro teste, foi analisada a frequência ou número de poços que apresentavam os diferentes fenótipos mediante o teste de χ^2 , considerando significativas as diferenças quando $P < 0,05$ com o pós teste Bonferroni.

Também foi analisada a quantidade desses fenótipos formados em cada poço, em cada condição utilizando o teste estatístico paramétrico de análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com nível de significância $P < 0,05$.

Ambas as análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0.

