ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIACÃO

**Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação
de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos
pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro**

São Paulo

2019

ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIACÃO

**Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação
de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos
pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, para a obtenção da Dupla Titulação de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Lawrence C. Smith

Co-orientador convênio dupla titulação

Universidade de La Frontera, Chile: Prof. Dr.
Mariano Del Sol Calderon

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3885
FMVZ

Anunciação, Adriana Raquel de Almeida da
Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro / Adriana Raquel de Almeida da Anunciação. – 2019.
119 f. : il.

Tese (Doutorado com Dupla Titulação em Ciências) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, Brasil e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadores: Prof. Dr. Lawrence C. Smith.
Prof. Dr. Mariano Del Sol Calderon.

1. Engenharia tecidual. 2. Células tronco. 3. Lesões cutâneas. I. Título.

ERRATA

ANUNCIACÃO, A. R. A. A. **Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro**. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019 - Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
Resumo	ANUNCIACÃO, A. R. A. A. Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro . 2019. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019 - Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.	ANUNCIACÃO, A. R. A. A. Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro . 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019 - Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial baixadeiro", protocolada sob o CEUA nº 8783120716 (ID 003130), sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Adriana Raquel de Almeida da Anunciação** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 05/01/2017.

We certify that the proposal "Morphological characterization of the integumentary system and differentiation of induced pluripotent cells in keratinocytes of horses belonging to racial grouping Baixadeiro", utilizing 8 Equines (males and females), protocol number CEUA 8783120716 (ID 003130), under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Adriana Raquel de Almeida da Anunciação** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2016** a **07/2019**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 6 anos**

N: **8**

Linhagem: **Cavalo Baixadeiro**

Peso: **250 a 350 kg**

Local do experimento: Coleta realizada na Baixada maranhense e cultivo celular no Laboratório de Células Tronco da Anatomia

São Paulo, 28 de setembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ANUNCIACÃO, Adriana Raquel de Almeida da

Título: Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupo racial Baixadeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, para a obtenção Dupla Titulação de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por todas as oportunidades e proteção divina a mim ofertadas.

A toda a minha **família, mãe, pai irmãos, tios e primos**. Desde sempre foram meu porto seguro e principal razão em nunca desistir; nos momentos que pensei em cair sempre lembrei de vocês, uma das razões pela qual eu estava aqui e com isso as coisas ficaram menos difíceis e fui vencendo dia após dia. Essa vitória de hoje com certeza é de vocês.

A minha orientadora **Profa. Dra. Maria Angelica Miglino** por todos os ensinamentos e principalmente pela confiança em mim depositada nestes três anos e meio para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador e supervisor do estágio realizado na Université de Montreal, **Prof. Dr. Lawrence Smith**, por me receber em seu laboratório e por todos os ensinamentos recebidos. E em especial a **Jacinthe Therrien** por me acompanhar nos experimentos, pela paciência nas explicações e por cada abraço que recebi, isso fazia eu me sentir em casa.

Ao meu co-orientador pelo programa de dupla titulação com a Universidade de la Frontera, Chile, **Prof. Dr. Mariano Del Sol Calderon** e a **Profa. Dr. Bélgica Vasquez**, por todo apoio e ensinamentos durante minha estadia no Chile.

Aos professores **José Roberto Kfoury Junior** e **Antonio Chaves de Assis Neto**, bem como ao Programa de Pós-Graduação por permitirem minha titulação nesta instituição de renome que é a Universidade de São Paulo.

Aos professores que durante a minha trajetória me inspiraram a gostar de pesquisa, em especial a **Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva** e ao **Dr. Daniel Praseres Chaves**.

Aos professores da Universidade Estadual do Maranhão que me auxiliaram nas coletas de material Biológico, á **Profa. Dr. Alana Lislea de Sousa , Prof Dr. Ricardo de Macedo Chaves e Felipe Junior.**

Ao seu **Zé Moleque da Baixada Maranhense**, pois sem o seu auxílio não conseguiria realizar as coletas de material biológico.

Aos funcionários e Técnicos, em especial: **Ana Paula (Paulinha), Daura Vaz, Ronaldo Agostinho e Rose Eli Graci.**

À **Capes**- Coordenação de pessoal de nível superior pelo financiamento do estágio no exterior (processo n 88881.190500/2018-01) e pela Bolsa (Proex-Demanda Social) durante o doutorado.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelo financiamento das coletas no estado do Maranhão.

Ao **Mitacs Globalink** pela bolsa concedida na Université de Montreal.

À todos os amigos da Universidad de la Frontera, que sempre me acolheram e me auxiliaram, um agradecimento especial aos amigos **Loreto Umanzor, Jeannette Duran, Juan Emilio, Marco Guerrero, Consuelo Arias, Cristian Vasquez, Paulo Salinas, Daniel Conei, Clivia Guerrero, Mariela Munoz, Nicolas Ernesto e Rodrigo Cofre.**

Aos amigos que fiz em Saint Hyacinth e que fizeram os meus dias mais alegres em especial a **Wilmer Martinez, Laura Ffranco, Mariela Srednik, Maria Helena, Yaindriz Rodriguez, Sarah Crespo, Yaima, Karina de Mattos, Rafael Sampaio, Carlos Fernandez, Johan, Rafaela Baptist, Marina Evangelista, Esdras Corrêa e Olivia Smith.** Sei que mesmo separados seguiremos nossas vidas e é para frente que se anda (sempre). E tudo bem em relação a isso, pois cada pessoa que conhecemos

na vida mesmo quando se vão, jamais nos deixam sós, pois deixam um pouquinho de si... e levam um pouquinho de nós.

Aos amigos residentes no estado do Maranhão, **Luciana Rosa, Alessandra e Elizandra**. Que apesar da distância sempre estiveram comigo nessa longa caminhada. Obrigada por ainda estarem presentes na minha vida.

Aos amigos que fiz no Crusp e que posso chamar de minha segunda família: **Denise Piccirilo, Debora Piccirilo, Barbara Soares, Patricia Anette, Viviane Vieira, Aline e Paulinha**. Agradeço todo o carinho, divertimento e respeito da nossa convivência.

Aos companheiros de laboratório na Pós-Graduação: **Thais Sasahara, Carla Carvalho, Amanda Sarago, Arthur Rodrigues, Cristiano, Bruna Aguiar, Catia Massari, Maria Angelica, Ana Clara, Ana Lídia, Ana Carolina, Rodrigo Barreto, Lara Carolina, Gustavo Sá, Jessica Borghesi**. Pois com todos aprendi algo. Em especial ao **Lucas Machado e Marina Lima** pois sempre estavam dispostos a ajudar.

Aos professores **Fabiana Fernandes Bressan e Ana Claudia Oliveira Carreira** por o auxílio durante a execução deste trabalho.

Aos amigos que conheci na Pós-Graduação e que levarei para a vida: **Luciano Leonel, Phelipe Oliveira (My heart), Renata Kelly, Andressa Cereta, Marilu Gioso e Patricia Romagnolli**, com vocês aprendi que eu não preciso mudar minha maneira de ser.

E por último e não menos importante agradeço ainda aos meus amigos os quais reservo lugar especial nestes agradecimentos e em meu coração, pois acredito que nada nessa vida é por acaso e que nunca pensei que teria uma afinidade tão forte quanto a que tenho com vocês: **Bruna Luiza e Bruna Breternitz**.

RESUMO

ANUNCIACÃO, A. R. A. A. **Caracterização morfológica do aparelho tegumentar e diferenciação de células pluripotentes induzidas em queratinócitos de equinos pertencentes ao grupamento racial Baixadeiro.** 2019. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019- Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

O cavalo Baixadeiro é um ecotipo rústico e com potencial de resistência ao clima típico da Baixada Maranhense, mais especificamente aos campos alagados desta região. Dessa forma, este trabalho teve diferentes objetivos e por isso foi dividido em quatro capítulos. No capítulo I propôs-se descrever a arquitetura e a estrutura do aparelho tegumentar; no capítulo II objetivou-se isolar e caracterizar fibroblastos para a conservação genética; o intuito do capítulo III foi estabelecer um protocolo de descelularização de pele que mantenha a arquitetura da matriz extracelular; finalmente no capítulo IV propôs-se diferenciar células tronco em queratinócitos. Como resultado do capítulo I, constatou-se que os embriões apresentavam diferenças na formação de epiderme ao longo das regiões corpóreas com a marcação da citoqueratina 18 no citoplasma do tecido epidermal em formação, proteína GFAP demonstrando a presença de receptores sensoriais durante o desenvolvimento da derme e colágeno tipo I na matriz extracelular. Como resultado do capítulo II, os fibroblastos apresentaram citoplasma alongado e núcleo esférico centralizado com alta capacidade de proliferação e com marcação para células tronco mesenquimais. Teve-se como resultado do capítulo III que os componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, fibras colágenas, fibronectina e laminina permaneceram após o uso de detergentes, indicando uma descelularização eficiente. Além disso, foi comprovado que os *scaffolds* permitiram o crescimento de fibroblastos fetais. No capítulo IV foi induzida a diferenciação de células tronco (células mesenquimais e células pluripotentes induzidas) em queratinócitos. Neste trabalho foi possível compreender a morfologia do sistema tegumentar com ênfase no cultivo de fibroblastos do cavalo Baixadeiro para a conservação genética, bem como a

associação de células tronco com a bioengenharia para a construção de um substituto de pele para lesões cutâneas em equinos.

Palavras-chave: Engenharia tecidual. Células tronco. Lesões cutâneas.

ABSTRACT

ANUNCIACÃO, A. R. A. A. **Morphological characterization of integumentary apparatus and differentiation of induced pluripotent cells in equine keratinocytes belonging to the Baixadeiro racial group.** 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.- Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

The Baixadeiro horse is a rustic ecotype with potential to resist the typical climate of the Baixada Maranhense, more specifically to the flooded fields of this region. Thus, this work had different objectives and was therefore divided into four chapters. In Chapter I, it was proposed to describe the architecture and structure of the integumentary apparatus; Chapter II aimed to isolate and characterize fibroblasts for genetic conservation; The purpose of Chapter III was to establish a skin decellularization protocol that maintains the architecture of the extracellular matrix; Finally, in Chapter IV it was proposed to differentiate stem cells into keratinocytes. As a result of chapter I, it was found that the embryos showed differences in epidermis formation along the body regions with cytokeratin 18 marking in the epidermal tissue cytoplasm. GFAP protein demonstrates the presence of sensory receptors during dermis development and type I collagen in the extracellular matrix. As a result of Chapter II, the fibroblasts presented elongated cytoplasm and centralized spherical nucleus with high proliferation capacity and marked for mesenchymal stem cells. As a result of Chapter III, extracellular matrix components such as proteoglycans, collagen fibers, fibronectin and laminin remained after detergent use, indicating efficient decellularization. In addition, it has been shown that scaffolds allowed the growth of fetal fibroblasts. Chapter IV induced differentiation of stem cells (mesenchymal cells and induced pluripotent cells) into keratinocytes. In this thesis, it was possible to understand the morphology of the integumentary system with an emphasis on the cultivation of lowland horse fibroblasts for genetic conservation, as well as the association of stem cells with bioengineering to construct a skin substitute for skin lesions in horses.

Keywords: Tissue engineering. Stem cells. Skin lesions

RESUMEN

ANUNCIACÃO, A. R. A. A. **Caracterización morfológica del aparato tegumentario y diferenciación de células pluripotentes inducidas en queratinocitos equinos pertenecientes al grupo racial Baixadeiro**. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.- Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2019.

El caballo Baixadeiro es un ecotipo rústico con potencial para resistir el clima típico de la Baixada Maranhense, específicamente los campos inundados de esta región. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo objetivos diferentes que se abordaron en cuatro capítulos. En el Capítulo I se propuso describir la arquitectura y la estructura del aparato tegumentario; el Capítulo II tuvo como objetivo aislar y caracterizar los fibroblastos para la conservación genética; el propósito del Capítulo III fue el de establecer un protocolo de descélularización de la piel que mantenga la arquitectura de la matriz extracelular; y por último el Capítulo IV se propuso diferenciar las células madre en queratinocitos. Como resultado del capítulo I, se descubrió que los embriones mostraban diferencias en la formación de la epidermis a lo largo de las regiones del cuerpo, con marcas de citoqueratina 18 en el citoplasma del tejido epidérmico, de proteína GFAP que demuestra la presencia de receptores sensoriales durante el desarrollo de la dermis, y de colágeno tipo I en la matriz extracelular. Como resultado del Capítulo II, los fibroblastos presentaron citoplasma alargado y núcleo esférico centralizado con alta capacidad de proliferación y marcado para células madre mesenquimales. Como resultado del Capítulo III, los componentes de la matriz extracelular como los proteoglicanos, las fibras de colágeno, la fibronectina y la laminina permanecieron presentes después del uso de detergente, lo que indica una descélularización eficiente. Además, se demostró que los andamios permiten el crecimiento de fibroblastos fetales. En el capítulo IV se indujo la diferenciación de células madre (células mesenquimales y células pluripotentes inducidas) en queratinocitos. El presente trabajo permitió comprender la morfología del sistema tegumentario con énfasis en el cultivo de fibroblastos de caballo Baixadeiro para la

preservación genética, así como la asociación de células madre con bioingeniería para producir un sustituto de la piel para lesiones cutáneas en caballos.

Palabras clave: bioingeniería tisular. Células madre. Lesiones cutáneas

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Cavalo Baixadeiro em dois períodos climáticos diferentes.....	15
Figura 02 - Esquema de reprogramação, transdiferenciação e desdiferenciação	16
Figura 03 - Fluxograma da diferenciação de células-tronco, seguido pela cultura de células usando biomateriais	16
Figura 04 - Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de embriões equinos com idades estimadas de 20 a 36 dias.....	16
Figura 05 - Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de fetos equinos com idades estimadas de 40 a 50 dias.....	16
Figura 06 -Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de fetos equinos com idades estimadas de 52 a 69 dias	16
Figura 07 - Características microscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de embriões e fetos equinos com idades estimadas de 20 a 52 dias	16
Figura 08 - Análise de Imunohistoquímica do sistema tegumentar de embriões e fetos equinos.....	16
Figura 09 - Ensaio metabólico MTT em meio Dmem Ham's F12, F- Ensaio metabólico MTT em meio Mem/ Alpha, G- Dmem High Glucose	16
Figura 10 - Células obtidas de pele de equino "Baixadeiro" cultivadas em meio Dmem Ham's - F12 suplementados com soro fetal bovino.....	16
Figura 11 -Imunocitoquímica de fibroblastos de cavalo "Baixadeiro" em P4.....	16
Figura 12 - Esquema de coleta e descelularização da pele de cavalo.....	16
Figura 13 - Esquema de recelularização com fibroblastos fetais.....	16
Figura 14 -Análise das amostras após o processo de descelularização.....	16
Figura 15 -Análise das fibras colágenas dos <i>scaffolds</i> controles e descelularizados.	16
Figura 16 -Imunofluorescência dos <i>scaffolds</i> controles e descelularizados.....	16
Figura 17 -Quantificação de DNA genômico das amostras descelularizadas e controle	16
Figura 18 -Recelularização de <i>scaffolds</i>	16

Figura 19 -Esquema de transfecção de fibroblastos fetais do cavalo Baixadeiro e controle	16
Figura 20 -Esquema do protocolo de diferenciação de células mesenquimais em queratinócitos sobre <i>scaffolds</i> do cavalo Baixadeiro e Puro Sangue Inglês.....	16
Figura 21 -Esquema usado para a diferenciação de eiPSC em keratinócitos.....	16
Figura 22 - Análise da expressão gênica das linhagens eiPSC.....	16
Figura 23 -Esquema usado para a diferenciação de eiPSC em keratinócitos.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de crescimento e seu alvo na diferenciação celular.....	18
Tabela 2 - Dados biométricos de embriões e fetos equinos (<i>Equus caballus</i>), São Paulo, 2018.....	19
Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados para caracterização das iPSCs.....	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	ECOSSISTEMA DA BAIXADA MARANHENSE	21
2.2	O CAVALO BAIXADEIRO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO GENÉTICA	24
2.3	REGULAÇÃO MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TEGUMENTAR	26
2.4	DESDIFERENCIAÇÃO, TRASNDIFERENCIAÇÃO E REPROGRAMAÇÃO CELULAR.....	29
2.5	REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS	32
2.6	UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAL PARA MEDIAR A DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	34
3	HIPÓTESES	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	CAPÍTULO I	39
4.1	INTRODUÇÃO.....	40
4.2	MATERIAL E METODO	41
4.2.1	ANIMAIS.....	41
4.2.2	ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS	42
4.2.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
4.2.4	MICROSCOPIA DE LUZ DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS.....	42
4.2.5	IMUNOHISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS PARA CITOQUERATINA 18 E COLÁGENO I.....	43
4.3.	RESULTADOS	43
4.3.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE EMBRIÕES E FETOS.....	43

4.3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA	50
4.3.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EQUINOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO	52
4.4. DISCUSSÃO	53
4.5. CONCLUSÃO	57
4.6 REFERÊNCIAS	58
5 CAPÍTULO II	62
5.1 INTRODUÇÃO	63
5.2 MATERIAL E MÉTODO	64
5. 2.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	64
5.2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE EQUINOS	64
5. 2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FIBROBLASTOS	65
5. 2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FIBROBLASTOS.....	65
5. 2.5 TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA	66
5. 2.6 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS	66
5. 2.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DOS FIBROBLASTOS	66
5. 2.8 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT DOS FIBROBLASTOS	67
5. 2.9 IMUNOCITOQUÍMICA DOS FIBROBLASTOS	67
5.3 RESULTADOS	68
5. 3.1 ISOLAMENTO E MORFOLOGIA CELULAR.....	68
5.3.2 ANÁLISE DE MICOPLASMA, CURVA DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE CELULAR	68
5.3.3 ANÁLISE DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO- MTT	70
5. 3.4 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFENOTIPAGEM DOS FIBROBLASTOS...	71
5. 4 DISCUSSÃO.....	72
5.5 CONCLUSÃO	74
5.6 REFERÊNCIAS	74
6 CAPÍTULO III	78
6.1 INTRODUÇÃO.....	79
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	80

6.2.1 ANIMAIS.....	80
6.2.2 DESCELULARIZAÇÃO DA PELE	80
6.2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS	81
6.2.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	82
6.2.5 RECELULARIZAÇÃO COM FIBROBLASTO FETAL	82
6.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NOS <i>SCAFFOLDS</i>	83
6.2.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA	83
6.3 RESULTADOS	84
6.4. DISCUSSÃO	89
6.5 CONCLUSÃO.....	91
6.6 REFERENCIAS	91
7 CAPÍTULO IV	94
7.1 INTRODUÇÃO	94
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS	95
7.2.1 Animais.....	96
7.2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EQUINAS	96
7.2.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FIBROBLASTOS FETAIS DE EQUINOS.....	96
7.2.4 TRANSFEÇÃO DOS FIBROBLASTOS FETAIS EQUINOS	96
7.2.5 ESTABELECIMENTO DE LINHAS CELULARES EIPS	97
7.2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES EIPS	97
7.2.7 FOSFATASE ALCALINA.....	98
7.2.8 EXTRAÇÃO DE RNA e qPCR PARA AS LINHAGENS EIPS.....	98
7.2.9 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EM KERATINÓCITOS NO MODEL 2d E 3d	100
7.3 RESULTADOS	102
5.6 REFERÊNCIAS	105
CONCLUSÃO GERAL.....	107
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

A Baixada Maranhense está localizada nas planícies do Estado do Maranhão com extensas áreas alagadas (Pereira et al., 2016). Do ponto de vista ecológico os campos naturais inundáveis da Baixada Maranhense são ambientes complexos e diversificados, sendo constituídos por lagos rasos temporários que ocupam toda a planície de inundação, e por importantes sistemas lacustres permanentes (COSTA-NETO et al., 2001).

Neste ambiente com características peculiares, é possível encontrar o cavalo “Baixadeiro”. Estes animais conseguem sobreviver seis meses em campos alagados, ou seja, são animais rústicos e resistentes ao clima da região, assim como as doenças usualmente decorrentes dessas condições. Esta adaptação ao ambiente local é uma característica importante das raças naturalizadas, o que engloba a tolerância e adaptação ao calor, a adaptação às condições de seca e cheia, a utilização espacial do solo e hábito alimentar (SANTOS et al., 2003., GAZOLLA et al., 2009; CHAVES et al., 2015; SERRA., 2004).

A adaptação dos animais a este ambiente, está relacionado também ao seu sistema tegumentar, o qual exerce importante função na termorregulação. Sabe-se que todos os componentes do tegumento podem ser considerados modificações do epitélio superficial, provenientes do ectoderma embrionário, que atuam em conjunto com um componente vascular subjacente derivado do mesoderma (LEE et al., 2018). Outro constituinte do sistema tegumentar é o casco, que surge a partir de um segmento específico chamado de corpo papilar e a partir do aumento da atividade mitótica das células epidérmicas formam microrrugos dérmicas, e posteriormente em papilas dérmicas (BRAGULLA, 2003).

As lesões tegumentares em equinos são causadoras comuns de perdas econômicas na medicina veterinária (SCOTT, 2011) principalmente quando estão localizadas nas extremidades distais dos membros, pois necessitam de tratamentos mais intensivos e caros (THEORET, 2006). Em decorrência disso, muitas células provenientes da pele têm sido cultivadas, devido ao fato de poderem ser consideradas reservatórios de células tronco multipotentes, para serem

utilizadas em terapias no auxílio de processo de cicatrização de feridas (TOMMASI JUNIOR, 2017).

O uso de células-tronco adultas tem uma abordagem promissora para o tratamento de múltiplas doenças e distúrbios (BAJADA et al., 2008), pois possuem duas características importantes: a sua capacidade de auto-renovação e a capacidade de se diferenciar em tipos específicos de células sob condições de cultura apropriadas. As células-tronco mesenquimais (CTMs) são uma classe de células que possuem um potencial distinto de diferenciação e podem ser usadas para reparo e regeneração de tecidual (MOLOFSKY et al., 2004).

Em cultivo, as células tronco mesenquimais já foram isoladas de diversos tecidos, tais como: medula óssea, tecido adiposo, membrana sinovial, dentes, fontes neonatais (como sangue do cordão, tecido do cordão umbilical) e pele (derme) (TOMMASI JUNIOR et al., 2001; LU et al. 2006; REBELATTO et al., 2008; BIANCO et al., 2008; SECCO et al., 2009; LEE et al., 2016). Considerando a pele o maior órgão do organismo, e potencialmente com o maior número de células tronco, pode ser esta uma fonte de fácil obtenção, com capacidade de ser reprogramada (LIANG et al., 2002).

A reprogramação celular representou um grande avanço a ciência, uma vez que, é uma alternativa aos eventuais problemas de utilização de células pluripotentes derivadas de embriões e também podem ser produzidas sem os problemas de rejeição imune para modelos de doenças, terapias de transplante e medicina regenerativa (ZHOU E ZENG, 2013). Ainda neste mérito, sobre diferenciação de iPS em diferentes tipos celulares, foi demonstrado a diferenciação em queratinócitos nas espécies murinas e equinas, a fim de realizar a reconstituição da epiderme lesionada por traumas (BILOUSOVA et al., 2011; AGUIAR et al., 2015).

Sabe-se que os equinos do grupamento racial Baixadeiro apresentam um potencial de adaptação ao ambiente, principalmente em relação as doenças do sistema tegumentar. Desta forma, a produção de iPS a partir de células derivadas de fibroblastos de pele possam representar um avanço em terapia celular para o tratamento de lesões cutâneas em equídeos. Além disso, a produção de iPS também pode ser considerada relevante para a conservação da rusticidade destes animais. Pois, uma das utilidades das células pluripotentes induzidas é a

constituição de um banco de germoplasma para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (BEM-NUM, 2011). Vale salientar que a integridade do grupamento racial Baixadeiro se encontra ameaçada devido a constantes cruzamentos com animais de outras raças e a falta de manejo adequado do rebanho sendo considerado na categoria de “risco desconhecido”.

Devido a todos estes fatores, acredita-se que este trabalho gerará novos dados acerca das potencialidades destes animais, porquanto até o momento nada se sabe sobre isso, contribuindo desta maneira para o conhecimento e preservação deste grupamento racial bem como para avanços em bioengenharia tecidual para o reparo de lesões cutâneas em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ECOSSISTEMA DA BAIXADA MARANHENSE

O Estado do Maranhão, por estar localizado em uma área de transição entre o Norte Amazônico e o Nordeste semi-árido, destaca-se dentre os demais estados brasileiros pela variedade de ecossistemas em seu território, com diferentes formações paisagísticas. Neste contexto, está inserida a região da Baixada Maranhense que é considerada uma Área de Proteção Ambiental (APA) no Estado do Maranhão, abrangendo uma área de aproximadamente 1775.035,6 hectares (ARAÚJO; SOUZA; FERNANDES, 2003; DIAS, 2005).

A microrregião da Baixada Maranhense, também conhecida como “Pantanal Maranhense”, está localizada a leste da Ilha de São Luís, no Norte do Estado do Maranhão (1°59'-400' S e 44°22'-45°33'W). Ao Norte do estado, faz divisa com o litoral e o Oceano Atlântico, já ao Sul com a região dos Cacaís, a leste com a região Pré-Amazônica e a Oeste, com o Cerrado (PEREIRA et al, 2013).

A Baixada Maranhense está localizada nas planícies do Estado com extensas áreas rebaixadas, que correspondem às áreas alagadas. O solo desta região é composto por depósitos flúvio-marinhos holocênicos, onde predominam os Gleisolos e solos Aluviais. De modo geral, a vegetação é composta

principalmente por gramínea nas áreas úmidas e alagadas e na periferia dos cursos d'água e brejos. Em certos locais, apresenta-se arbustiva, recebendo a denominação de “tezos” (MARANHÃO, 2003). As planícies alagáveis são encontradas nos entornos dos sistemas fluviais, pois a região possui o maior conjunto de bacias lacustres do Nordeste sendo banhado pelas bacias hidrográficas dos rios Mearim e Pindaré e pelas bacias secundárias do rio Turiaçu e do rio Pericumã (COSTA-NETO et al., 2001; LAFONTAINE; LAFONTAINE, 2009).

Do ponto de vista ecológico os campos naturais inundáveis da Baixada Maranhense são ambientes extremamente complexos, com estrutura e funcionamento bem diversificados, sendo constituídos por lagos rasos temporários que ocupam toda a planície de inundação e por importantes sistemas lacustres permanentes (COSTA-NETO et al., 2001).

As áreas alagáveis que margeiam grandes rios formam um dos ecossistemas naturais mais procurados para a ocupação humana em decorrência de sua fertilidade (JUNK, 1980). Além disso, as regiões com presença de várzeas possuem um significado ecológico importante devido à sua enorme riqueza biológica, resultante da alta produtividade aliada à grande multiplicidade de cadeias alimentares (COSTA-NETO et al., 2001).

Os alagamentos vêm da pluviosidade anual, que varia entre 1258 mm e 2221 mm, sendo a média de 1823 mm. O período chuvoso (janeiro a julho) é caracterizado por umidade relativa alta (em torno de 80%), contribuindo assim para a redução das taxas de evaporação. Durante o período seco (agosto a dezembro), observa-se uma maior radiação solar na superfície, constatada pelo aumento da insolação, favorecendo a elevação das taxas de evaporação (BITTENCOURT et al., 1990). Variações nas temperaturas são características das estações do ano, onde os valores mínimos são observados durante o período chuvoso com valor médio em torno de 24°C e o valor máximo de 38,5°C (EL-ROBRINI et al., 2007), sendo que assim os valores da umidade relativa do ar e as taxas das temperaturas contribuem para que ocorra a formação dos campos alagados desta região.

Esta região contém uma rica fauna com a presença de aves como a jacanã (*Porphyryula martinica*), a garça branca (*Ardea alba*), garça azul (*Egretta caerulea*), marreca cabocla (*Dendrocygna bicolor*), alma-de-gato (*Guira guira*), anum preto (*Crotophaga ani*), jandaia (*Conorus aureus*), curió (*Oryzoborus*

angolensis), guriatã (*Ueponia violácea*), jaçanã (*Parra jacana*), maracanã (*Ara maracanã*), papa-capim ou coleira, pardal (*Passer domesticus*) sabiá (*Turdus sabia*); Peixes como o acará (*Cichlasoma psittacus*); jeju (*Erythrinus unitaeniatus*), traira (*Hoplias malabaricus*); Mamíferos como a cutia (*Dasyprocta aguti*), paca (*Cuniculus paca*), preá (*Cavea aperea*); bicho-preguiça (mamífero da ordem Xenarthra), raposa (*Pseudalopex vetulus*), macaco-prego (*Cebus apela*), caititu (*Pecari tajacu*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) (GOVERNO DO ESTADO DO MARANHÃO, 2007; LAFONTAINE, 2012).

Além de ser encontrado uma flora peculiar com a presença de buritis (*Mauritia flexuosa*), aningas (*Montrichardia arborescens*), embaúba (*Cecropia scyardophylla mart*), o anani (*Symphoni globulifera*), a juçara (*Euterpe edulis*), o inajá (*Maximiliana martiniana*) e a andiroba (*Carapa guianensis*) (LAFONTAINE, 2012; ABREU E FREITAS, 2012).

A dinâmica das águas determinada pela pluviosidade influencia a ecologia das diversas espécies de flora e fauna deste ecossistema, chamado de campos naturais da Baixada Maranhense, bem como as possibilidades de atividades econômicas acessíveis à população local, que se ocupa basicamente das atividades primárias como a pesca, a agricultura e o extrativismo de frutos e fibras vegetais principalmente do babaçu (*Obygnya martiane*) da juçara (*Euterpe edulis*) (DIAS et al., 2005). Ainda assim, os campos alagados servem como áreas de pastoreio para o gado bovino e bubalino (*Bubalus bubalis*) durante os meses de julho a dezembro, período em que a incidência de chuvas no estado é menor. Porém, de janeiro a junho os campos tornam-se totalmente inundados, favorecendo uma elevada produtividade e biodiversidade, sobretudo de peixes, principal base alimentar e econômica da região (IBAÑEZ et al., 2000; COSTA-NETO et al., 2001).

Neste contexto está inserido um grupamento racial equino naturalizado e com alto potencial de adaptação as condições ecológicas da região, chamado pela população local de cavalo Baixadeiro.

2.2 O CAVALO BAIXADEIRO E SUA IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO GENÉTICA

O cavalo “Baixadeiro” é oriundo do cruzamento de raças trazidas da Península Ibérica, provavelmente dos cavalos Garrano e Berbere. Morfologicamente, o porte do cavalo “Baixadeiro” varia de pequeno a médio, com cerca de 1,40 m de cernelha com pelagem predominantemente a tordilha, castanha e rosilha (SERRA, 2004; GAZOLLA et al., 2009).

Estes animais conseguem sobreviver seis meses em campos alagados e seis meses em solo árido (Figura 1), ou seja, são animais rústicos e com alto potencial de resistência às intempéries ambientais, assim como as doenças usualmente decorrentes dessas condições. Esta adaptação ao ambiente local é uma das características mais valiosas destes animais, o que engloba a tolerância e adaptação ao calor, adaptação às condições de seca e cheia, uso espacial do solo e hábito alimentar (SANTOS et al., 2003; SERRA, 2004; GAZOLLA et al., 2015; CHAVES et al., 2015).

Figura 1: Cavalo Baixadeiro em dois períodos climáticos diferentes.

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: (A) Período chuvoso, sendo possível observar que os animais ficam com os membros submersos nos campos alagados; (B) Período seco

O sistema de criação realizado na Baixada Maranhense condiz com a rusticidade adquirida pelos animais, pois são criados soltos sem manejo reprodutivo, no qual a monta natural não é monitorada (CHAVES et al., 2015). As éguas apresentam época de parição contínua, com parto natural e o cio ocorrendo entre junho e setembro, período no qual é observada a maior oferta de alimentos (DIAS et al., 2013; LIMA et al., 2013).

O cavalo “Baixadeiro” exerce importante papel no trabalho e na vida diária da população da Baixada Maranhense, que vive da pecuária e da agricultura familiar. Esses animais são utilizados como meio de transporte para as comunidades locais e também são um grande aliado nas atividades pecuárias, garantindo a manutenção dos meios de produção agrícola da região (SERRA, 2004).

Estima-se que a população de equino Baixadeiro esteja em torno de 4 mil animais, que influenciam as condições socioeconômicas dos habitantes da região (SERRA, 2004). Entretanto, segundo os criadores, a cada ano ocorre a diminuição da população do cavalo Baixadeiro, em decorrência dos cruzamentos indiscriminados com outras raças, além dos acasalamentos consanguíneos, manejo sanitário e reprodutivo inadequado, o que a longo prazo, poderá causar a extinção desses animais na Baixada Maranhense (SANTOS et al., 2013). O risco de extinção do cavalo Baixadeiro pode levar a perda das características de resistência destes animais, o que torna necessário o estudo sobre a potencialidade de adaptação dos mesmos ao ambiente da região, sobretudo a sobrevivência aos campos alagados durante o período chuvoso e sua adaptação ao estresse térmico durante o período seco.

A conservação e o desenvolvimento de raças localmente adaptadas são importantes porque estas utilizam alimentação de baixa qualidade, são mais resistentes a doenças e parasitas presentes em suas regiões, e representam uma fonte única de genes a serem utilizados para aumento de características produtivas e para a manutenção da saúde em animais de raças comerciais. Dessa forma, acredita-se que animais geneticamente adaptados a essas condições sejam mais produtivos e com baixos custos, sendo, portanto, fundamentais para comunidades locais (CARDELLINO, 2005).

Uma das alternativas para a conservação de material genético de raças localmente adaptadas é a constituição de um banco de germoplasma. Este por sua

vez, pode ser realizado por meio da criopreservação de gametas, embriões e outras células/amostras de tecido ou DNA. Programas de conservação in situ e ex situ para raças em risco de extinção podem ser beneficiados com técnicas de biotecnologias da reprodução, incluindo inseminação artificial com sêmen congelado, superovulação e transferência de embriões, produção in vitro de embriões, micromanipulação de gametas/embriões, sexagem de sêmen/embriões e banco de genoma (GALLI et al., 2003; ANDRABI E MAXWELL, 2007; RAMOS et al., 2011). Além disso, por meio da criopreservação de células, como fibroblastos por exemplo, juntamente com o auxílio de biotecnologias é possível hoje reprogramá-la em uma célula pluripotente e futuramente diferenciá-la em qualquer tipo de célula (BAVIN, et al 2015; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Dessa forma, usando técnicas inovadoras é possível resgatar populações que estejam sofrendo extinção e que tenham importantes características para a pecuária nacional (SILVA et al., 2012).

2.3 REGULAÇÃO MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TEGUMENTAR

Todos os componentes do tegumento podem ser considerados modificações do epitélio superficial, proveniente do ectoderma embrionário, em conjunto com um componente vascular subjacente derivado do mesoderma (LEE et al., 2018). A pele é constituída por uma fração epitelial de origem ectodérmica, sendo está a epiderme, e uma outra fração conjuntiva oriunda da mesoderme subjacente, a derme. Em fetos, a epiderme é formada inicialmente por uma camada de células epiteliais cúbicas e conforme ocorre a proliferação dessas células, sucede a sua estratificação (VELTRI & LANG, 2018).

A derme por sua vez, desenvolve-se a partir da proliferação de células mesenquimais primitivas, sendo está dividida em camada superficial e camada profunda. Esse tecido primitivo sofre maturação no período fetal, para formar a derme do recém-nascido. O amadurecimento da derme é determinado por várias fases, onde as principais são: o aumento da espessura e do número de fibras colágenas, diferenciação de células mesenquimais precursoras em fibroblastos e

a substituição gradativa do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I. Após o seu completo desenvolvimento, a derme passa a ser amplamente vascularizada e inervada, além dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas, sebáceas e outras glândulas que fazem parte dessa camada do epitélio (MARCOS-GRACES et al., 2014).

Outro constituinte do sistema tegumentar é o casco, sendo este originado a partir de um segmento específico chamado de corpo papilar, iniciado pelo aumento da atividade mitótica das células epidérmicas invaginantes, formando assim microrrugos dérmicas que são transformados em papilas dérmicas. Esta formação de um corpo papilar específico possibilita o aumento da queratinização na epiderme do casco e a formação dos túbulos córneos e lamelas (BRAGULLA, 2003).

O desenvolvimento da epiderme em mamíferos é um processo de várias etapas que inclui a iniciação, morfogênese e diferenciação. Padrões distintos de sinalização em diferentes estágios de desenvolvimento garantem o crescimento e progressão da epiderme e de seus derivados (THESLEFF et al., 1995; HAMARICK et al., 2001; RINN et al., 2008; KOSTER & ROOP, 2007). A sinalização Wnt é uma das principais vias para o desenvolvimento e diferenciação da pele, pois as especificações das células ectodérmicas no destino epidérmico, logo no início do desenvolvimento embrionário, são desencadeadas pela sinalização Wnt, que inibe a resposta do ectoderma aos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) (VELTRI et al., 2017). Na ausência de sinalização FGF, as células ectodérmicas expressam proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e adquirem um destino epidérmico (WILSON et al., 2001; FUCHS et al., 2007).

Além deste, pode-se salientar o fator de crescimento transformador (TGF- β), o qual consiste em polipeptídios secretados que incluem TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (KAHATA et al., 2017). A família TGF- β é um estimulante de divisão celular na epiderme e especialmente a BMP4 é um indutor epidérmico (STERN, 2005). Estudos em camundongos transgênicos já comprovaram que esta família tem funções de diferenciação epidérmica, além dos efeitos da morfogênese folicular. O aumento da expressão do TGF- β 1 causou, por exemplo, a privação do ciclo celular dos queratinócitos (MASSAGUE, 2012), bem como a hiperqueratose e uma distribuição esparsa de folículos pilosos em camundongos (SELLHEYER et al., 1993).

A queratina é a principal proteína estrutural dos queratinócitos, e existe uma sequência de expressão desta proteína na formação da pele. Durante o seu desenvolvimento, a camada única de células epiteliais expressa inicialmente queratinas K8/K18. Posteriormente é substituída pela expressão de K5 / K14 antes de ocorrer a estratificação (BYRNE et al., 1994). Alguns estudos sugerem que a proteína p63 desempenha um papel significativo na formação da epiderme e indução das proteínas K5/K14. A p63 é tão importante no desenvolvimento epidérmico embrionário que sua ausência impede a estratificação do epitélio, levando a defeitos em estruturas derivadas do epitélio mesenquimal como as glândulas mamárias (M'BONEKO & MERKER, 1998).

No processo de morfogênese, a expressão de Bmp4 é envolvida inicialmente na condensação mesenquimal da extremidade dos membros juntamente com o gene Sonic hedgehog (Shh) (DROSSOPOULOU et al., 2000). Este por sua vez, também está envolvido na proliferação e no crescimento do folículo piloso. Outras moléculas são importantes no processo de queratinização como o gene homeobox Hoxc-13 que foi expresso em unhas, cauda, vibrissas e nos folículos pilosos de embriões de ratos (GODWIN & CAPECCHI, 1998).

Vale ressaltar que os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) são ativos tanto em embriões durante a diferenciação tecidual, bem como no desenvolvimento dos órgãos. Estudos em camundongos relataram a expressão de receptores de crescimento de fibroblastos (FGR-1) no mesênquima dos brotos dos membros e nos somitos, enquanto o FGR-2 foi expresso predominantemente nas células epiteliais de embriões e órgãos em desenvolvimento (PETERS et al., 1992). Em decorrência da sua alta capacidade de regular níveis de funções celulares no tecido epitelial, o que inclui adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (tabela 1) (YUN et al., 2010) tem sido realizada muitas pesquisas em associação destes fatores de crescimento ao processo desdiferenciação e transdiferenciação celular.

Tabela 1: Fatores de crescimento e seu alvo na diferenciação celular

Função	Subfamília relacionada a função	Alvo celular	Referência
Proliferação celular	FGF7	Células epiteliais	FINCH et al., 1989; TAGASHIRA et al., 1997
	FGF10		THOMSON & CUNHA 1999 TAGASHIRA et al., 1997
Migração celular	FGF7	Células epiteliais e Queratinócitos	TSUBOI et al., 1993
	FGF 1, FGF-2, FGF-7 (KGF-1), FGF 10 (KGF-2) FGF-22		PEPLOW & CHATTERJEE 2013; SEEGER & PALLER, 2015; RADEC et al., 2009 BEYER et al., 2003
Diferenciação celular	FGF7	Queratinócitos	WENER et al., 1993

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

2.4 DESDIFERENCIAÇÃO, TRASNDIFERENCIAÇÃO E REPROGRAMAÇÃO CELULAR

Na biologia do desenvolvimento, a diferenciação celular é o processo pelo qual uma célula menos especializada se torna um tipo de célula mais especializada. Este processo ocorre inúmeras vezes durante o desenvolvimento de organismos multicelulares à medida que um único zigoto se transforma em um complexo sistema de múltiplos tipos celulares. A diferenciação celular ocorre também em indivíduos adultos, pois, as células-tronco adultas se dividem e criam células-filhas completamente diferenciadas durante o reparo tecidual e a renovação celular normal (YUNG et al., 2010). Em humanos, este pode ser conseguido por meio da ativação de células-tronco localizadas em nichos específicos (como por exemplo, com o sangue) ou induzindo células diferenciadas a proliferar (como por exemplo, no fígado) (JOPLING et al., 2011). Isso porque os humanos apresentam uma capacidade limitada para regenerar e restaurar seus tecidos e órgãos, enquanto outras espécies

de vertebrados possuem ampla capacidade regenerativa (BROCKES & KUMAR 2002; JOPLING et al., 2011).

Um dos mecanismos associados à regeneração natural é a dediferenciação, o qual, uma célula diferenciada é revertida para um estágio menos indiferenciado dentro de sua própria linhagem. Este processo permite que a célula possa proliferar novamente antes de se transdiferenciar, levando à substituição das células que foram perdidas, a exemplo do que ocorre com os cardiomiócitos de zebrafish, os quais se proliferam durante a regeneração cardíaca (YOUNG-DAN & HYUN-MO, 2018).

A transdiferenciação é o processo do qual as células alteram até mudarem de linhagem, permitindo a sua diferenciação em outro tipo de célula, porém sem apresentarem pluripotência (Figura 2) (YOUNG-DAN & HYUN-MO, 2018). Em modelos *in vitro*, o processo de transdiferenciação é relativamente rápido e eficaz, dessa forma, muitos estudos vêm sendo realizados na busca dos fatores necessários para a conversão de tipos celulares específicos. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-1 e o FGF-2), por exemplo, desempenham papéis importantes na diferenciação inicial dos neurônios do gânglio coclear em camundongos (PETERS et al., 1992). Além disso, o FGF-2 estimula a diferenciação de células neuroepiteliais em neurônios e células da glia (MURPHY et al., 1990).

Figura 02: Esquema de reprogramação, transdiferenciação e dediferenciação. Células pluripotentes são capazes de se diferenciar em diferentes tipos celulares.

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019 adaptado de JOPLING et al., 2011)

Legenda: **(A)** Reprogramação de fibroblastos para regressar ao estágio de pluripotência é necessário a expressão de fatores de transcrição como OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC. Entretanto, células tronco neurais podem ser reprogramadas usando somente OCT4; **(B)**. Durante a transdiferenciação uma linhagem celular pode se diferenciar em outro tipo celular, por exemplo, células exócrinas do pâncreas podem ser induzidas a se transdiferenciarem em células B pela expressão de fatores de transcrição como homeobox duodeno 1 (PDX-1), neurogenin 3 (NGN3) and MAFA. Isto pode ocorrer diretamente ou pode estar envolvido no processo de dediferenciação; **(C)**. Dediferenciação se refere a regressão de uma célula madura sem mudança de linhagem, o qual em muitos casos permite que eles se proliferem, os cardiomiócitos de zebrafish se prolifera durante a regeneração cardíaca

No que se refere a transdiferenciação em células epidermais, o FGF-7 é essencial para a morfogênese e para a diferenciação dos queratinócitos supra basais (WERNER et al., 1993). Além deste, o fator de crescimento epidermal (EGF) tem sido relatado como capaz de induzir a transdiferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em linhagem epitelial (PAUNESCU et al., 2007). Em um estudo realizado por CHAVEZ-MUNOZ et al., (2013) demonstrou que o EGF em combinação com uma concentração aumentada de cálcio foi o suficiente para induzir a transdiferenciação de células adiposas em células semelhantes a queratinócitos.

Vale ressaltar que o processo de reprogramação celular requer uma alteração de reversão de uma célula diferenciada em uma célula pluripotente. A reprogramação ocorre naturalmente durante a fertilização para produzir células totipotentes que podem se diferenciar em muitos tipos celulares. A indução ao processo de reprogramação a partir da expressão forçada de fatores de transcrição relacionados à pluripotência como o Oct3/4, Sox2, KLF4 e C-MYC trouxe muitas vantagens à ciência, uma vez que, é uma alternativa aos eventuais problemas de utilização de células pluripotentes derivadas de embriões (ZHOU, Y.-Y.; ZENG, 2013). (CIESLAR-POBUDA et al., 2017; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

2.5 REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS

As células somáticas podem ser reprogramadas em células pluripotentes por meio da (a) transferência nuclear de células somáticas em oócitos, (b) combinação de fatores expressos nas células pluripotentes por meio da fusão celular e (C) reprogramação direta (DO & SCHOLER, 2006; FULKA, FIRST, LOI, & MOOR, 1998; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006; RENARD, 1998; WADE & KIKYO, 2002; WILMUT, YOUNG, & CAMPBELL, 1998; Yang 2010).

O processo de transferência nuclear envolve uma célula doadora somática e um oócito não fertilizado e enucleado. O DNA nuclear das células somáticas é transplantado para o oócito enucleado levando à união de ambos os componentes. Esta célula reconstruída é estimulada por meio do aumento na concentração de cálcio intracelular a iniciar o desenvolvimento do embrião (FULKA, LOI, FULKA, PTAK, & NAGAI, 2004).

Estudos têm mostrado que células totalmente diferenciadas podem ser diferenciadas por meio da transferência nuclear, gerando células reprogramadas. No entanto, estas células podem apresentar a reprogramação defeituosa, levando à morte de recém-nascidos clonados após a implantação ou ao seu nascimento com anormalidades (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2003; YANG, et al., 2007). A análise dessas células que falharam revelou vários defeitos nucleares resultantes da remodelação incompleta dos núcleos das células doadoras e /ou desregulação da expressão gênica de genes específicos de células diferenciadas (YANG, et al., 2007).

Outro método usado para a geração de células somáticas reprogramadas é a partir da fusão celular entre uma célula somáticas e uma células-tronco embrionária. Este por sua vez, contém fatores de reprogramação que podem modificar o estado epigenético do núcleo somático após ser fundido com uma célula somática (FLASZA et al., 2003). Essas células reprogramadas expressam pluripotência incluindo marcadores de Oct4, Sox2 e Nanog (COWAN, ATIENZA, MELTON, & EGGAN, 2005; DO & SCHOLER, 2004). Entretanto, devido ao processo de fusão ineficiente relatado em pesquisas, tem sido difícil até mesmo estudar moléculas envolvidas na reprogramação nesta técnica.

Mais recentemente, as células somáticas foram reprogramadas pela adição de fatores de transcrição, os quais incluem o OCT4, SOX2, C-MYC, KLF4, FBX15 e NANOG. Esses fatores sozinhos ou em combinação já foram introduzidos diretamente em células somáticas por meio de vetores virais e não virais e realizaram a reprogramação direta de células somáticas em células pluripotentes. Neste processo, a metilação do DNA, a modificação de histonas e a estrutura da cromatina precisam ser reprogramados para um estado que imita o desenvolvimento embrionário (YANG, 2010).

Apesar de todo o sucesso, a técnica iPS torna-se complicada pelos riscos potenciais que os vírus de integração do genoma representam. A expressão de transgenes exógenos é silenciada após a reprogramação, e esse silenciamento é indispensável para manter a pluripotência. Tais vetores virais integradores do genoma podem produzir mutações que podem influenciar o potencial de diferenciação, ou mesmo resultar em tumorigênese devido à reativação do oncogene C-MYC (ZHOU, Y.-Y.; ZENG, 2013).

Além de usar os vetores retrovirais e lentivirais para fornecer fatores de reprogramação, outros métodos têm sido utilizados para induzir células à pluripotência. Um desses métodos inclui a utilização de vetores adenovirais que permitem a expressão transitória e de alto nível de genes exógenos sem se integrar no genoma do hospedeiro (OKITA, et al., 2008). As células iPS utilizando vetores adenovirais expressam genes pluripotentes endógenos, formam teratomas e contribuem para formação de múltiplos tecidos, incluindo tecidos germinativos em camundongos quiméricos. Assim, a utilização de adenovírus para a reprogramação demonstra ser viável e sem causar alterações genéticas permanentes (STADTFELD et al., 2008).

Outro método inclui o sistema de transposição PiggyBac (MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2008). O sistema piggyBac é um transposon para integrar genes em células de mamíferos. Este sistema é capaz de fornecer grandes elementos genéticos sem redução significativa na eficiência. Ao contrário dos vetores virais, o sistema piggyBac não requer condições especiais de armazenamento ou controle de qualidade, não precisa ser preparado em altos títulos e não tem vida útil limitada. Outra vantagem deste sistema sobre os vetores virais é a não ocorrência de infecções virais (WOLTJEN, et al., 2009).

Após os avanços na reprogramação celular, vários experimentos têm sido realizados confirmando a indução a pluripotência em animais como em cães (SHIMADA et al., 2010), ovinos (BAO et al., 2011), caprinos (REN et al., 2011), suínos (ROBERTS; TELUGU; EZASHI, 2009; ZHOU, L. et al., 2011), bovinos (CAO et al., 2012) e equinos (BRETON et al., 2012). Dessa forma, a diferenciação de iPS em vários tipos de células tem se mostrado funcionais tanto para a constituição de um banco de germoplasma como para estudos de diversas doenças em modelos animais.

Sendo assim, BILOUSOVA et al., (2011) realizou a diferenciação de queratinócitos a partir de iPS murinas, as quais demonstraram capacidade de reconstituir uma epiderme estratificada e seus anexos quando enxertados em ratos. De acordo com estes resultados positivos, outros autores buscaram realizar esta mesma diferenciação em outras espécies, como por exemplo AGUIAR et al., (2015), a qual conseguiu realizar a diferenciação de iPS equinas em queratinócitos.

2.6 UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAL PARA MEDIAR A DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Nos tecidos, as células são incorporadas em uma matriz extracelular cercadas por várias outras células. Essas células sobrevivem no suporte da matriz extracelular, obtêm sinais biomecânicos de outras células da MEC, além de realizarem várias funções químicas, biológicas e mecânicas. Esses processos celulares exigem condições metabólicas e fisiológicas precisas. No entanto, a complexidade biológica das células e suas funções podem ser imitadas em uma cultura tridimensional (SINGH & ELISSEEFF, 2010).

A cultura 3D proporciona à célula um ambiente quase fisiológico para proliferação celular. Além disso, o microambiente extracelular 3D desempenha uma função importante no controle do comportamento celular, especialmente na diferenciação (Fig 03). A composição química da matriz, comportamento de degradação, propriedades mecânicas, química da superfície, porosidade ou estrutura espacial têm papéis importantes na diferenciação das células em relação

ao destino final da linhagem (ENGLER et al., 2019, SINGH & ELISSEEFF, 2010, DISCHER et al., 2005).

Figura 03: Fluxograma da diferenciação de células-tronco, seguido pela cultura de células usando biomateriais

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019 adaptado de SINGH E ELISSEEFF et al., 2010)

Muitos estudos enfatizaram a importância da elasticidade da matriz e do seu substrato na regulação da diferenciação celular de células-tronco (ENGLER et al., 2006). Essas células em matriz extracelular macias e rígidas podem sofrer comprometimento na linhagem osteogênica e neurogênica, respectivamente (DISCHER et al., 2005, ENGLER et al., 2006). Essas propriedades do substrato são críticas para a adesão e migração celular, difusão de nutrientes e resíduos, síntese e organização de matrizes.

Vários microambientes requerem biomateriais com diferentes propriedades, pois sua composição e funções são diferentes. Como exemplo, a cartilagem é feita de uma matriz de rede de colágeno com alto teor de água e proteoglicanos que podem

sustentar alta pressão compressiva. A pele, por exemplo, é essencialmente composta de células (por exemplo fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos) e ECM. Esta última é uma malha interligada dinâmica e organizada de muitas macromoléculas secretadas e enzimas proteolíticas diferentes como fibronectina, colágenos, proteoglicanos, heparina e sulfato de heparina, que se ligam a muitos fatores de crescimento, como fatores de crescimento de fibroblastos, TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento epidérmico e proteínas morfogenéticas ósseas (BRIZZI et al., 2012).

Os biomateriais naturais utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds* podem consistir em componentes encontrados na matriz extracelular (MEC), como colágeno, fibrinogênio, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos (GAGs), hidroxiapatita (HA) etc. e, portanto, têm a vantagem de serem bioativos, biocompatíveis e de propriedades mecânicas semelhantes com tecido nativo (DAWSON et al., 2008).

O colágeno é responsável por 30% de todas as proteínas do corpo em espécies de mamíferos e é altamente conservado (RUSZCZAK et al., 2003). Em seu estado natural, promove fixação, crescimento e diferenciação celular. Matrizes baseadas em colágeno apoiam o desenvolvimento e diferenciação de células mesenquimais e células tronco embrionárias com ou sem fatores de crescimento apropriados (FARRELI et al., 2006).

Células tronco embrionárias de camundongos (ESCs) em um arcabouço 3D de colágeno tipo I mostraram ser diferenciadas em cardiomiócitos e células endoteliais (EVANS et al., 2009). Da mesma forma, células-tronco embrionárias humanas se diferenciaram em células semelhantes a hepatócitos sobre *scaffolds* de colágeno. Esses estudos demonstraram a importância do colágeno como um suporte para o cultivo e diferenciação de células-tronco em diferentes fenótipos na matriz de colágeno, isto faz com que este seja um polímero importante e amplamente investigado.

As células tronco mesenquimais possuem um grande potencial de diferenciação, o que as torna opções de tratamento na medicina regenerativa e, nos últimos anos, emergiram rapidamente como tratamento de feridas agudas e crônicas (KOLF et al., 2007). A capacidade do *scaffold* para promover a diferenciação de MSC é provavelmente devido as comunicações ECM com células específicas dos órgãos (ZHANG et al., 2009; REILLY e ENGLER, 2010., FATIMA et al., 2018; GUILAK, et al., 2019).

Outra abordagem promissora para a engenharia de tecidos é o uso de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Já existe relatos na literatura sobre a utilização destas células no processo de diferenciação em ambiente tridimensional principalmente via formação de corpos embrióides (LEVENBERG, 2003). Os corpos embrióides dissociados enzimaticamente (LEVENBERG, 2005; KRAEHENBUEHL et al 2011) ou corpos embrióides inteiros são então encapsulados no biomaterial (FERREIRA et al., 2007).

Alguns *scaffolds* foram utilizados para diferenciação de iPSC, incluindo *scaffolds* formados por colágeno, dextrano, ácido hialurônico. Acreditamos que as propriedades mecânicas, químicas e arquitetônicas do *scaffold* seja importante para modular a diferenciação de iPSC equinas.

3 HIPÓTESES

É possível a criação de um banco de germoplasma por meio do isolamento e cultivo de fibroblastos;

É possível a indução a pluripotência de fibroblastos do cavalo Baixadeiro.

E possível a produção de *scaffolds* biológicos a partir da pele de cavalos e usá-los para a diferenciação de células mesenquimais e células pluripotentes induzidas em queratinócitos

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a arquitetura e a estrutura do aparelho tegumentar, com ênfase na caracterização dos fibroblastos para a conservação genética e a geração de células pluripotentes para diferenciação em queratinócitos sobre *scaffolds* biológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever o desenvolvimento do sistema tegumentar e seus anexos;

Caracterizar a linhagem celular de fibroblastos para a conservação genética do grupamento racial “Baixadeiro”;

Gerar iPSCs equinas por meio do sistema piggyBac;

Produzir *scaffolds* biológicos a partir da descelularização de pele do cavalo Baixadeiro e PSI;

Realizar a diferenciação de células pluripotentes induzidas e células mesenquimais em queratinócitos cultivadas sobre *scaffolds* biológicos.

4 CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS: ARQUITETURA, ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento do sistema tegumentar de equinos. Desta forma, foram utilizadas 40 amostras entre embriões e fetos equinos, sendo estas divididas em dois grupos: grupo I (20 a 36 dias gestacionais) e grupo II (40 a 75 dias gestacionais). Para realizar a descrição macroscópica, microscópica e imuno-histoquímica, fragmentos de pele e de casco foram coletados. Constatou-se que no grupo I, os embriões apresentavam diferenças na formação de epiderme ao longo das regiões corpóreas analisadas. Foi constatado também a marcação da proteína citoqueratina 18 no citoplasma do tecido epidermal em formação, proteína GFAP demonstrando a presença de receptores sensoriais durante a formação da derme e colágeno tipo I na matriz extracelular. Porém no Grupo II, os fetos com 40 dias apresentavam diferenciação da epiderme e da derme, bem como a formação do casco, o qual tem suas estratificações delimitadas somente aos 52 dias. Nesta mesma idade, também foi possível evidenciar o surgimento da glândula mamária e dos folículos pilosos. Conclui-se que as principais características do desenvolvimento do sistema tegumentar ocorrem na fase fetal. Dessa forma, o estudo do desenvolvimento da pele e seus anexos podem contribuir para a compreensão de doenças, para o diagnóstico e tratamento de doenças congênitas e adquiridas que podem acometer este sistema.

Palavras-Chaves: casco, citoqueratina, organogênese, pele.

4.1 INTRODUÇÃO

O tegumento comum em equinos é composto por pele sendo revestida por pelos, glândulas cutâneas e também por região especializada como o casco. A pele representa parte crucial do aparelho tegumentar, tendo a função de proteção contra invasão de microrganismos, desidratação e controle da termorregulação (SILVA, 2005; FERRARO et al, 2006; TOMMASI JUNIOR et al., 2014). Devido a isso, a pele representa a primeira barreira de proteção contra estas agressões, estando susceptível a muitas lesões. Por sua vez, o casco, é formado por uma queratinização epitelial sobre uma derme modificada, exercendo importante função de sustentação, absorção de impacto e auxílio de retorno de sangue para os membros (DYHRE-POULSEN et al., 1994).

As lesões tegumentares em equinos são causadoras comuns de perdas econômicas na medicina veterinária (SCOTT, 2011; PEREIRA et al., 2017), principalmente quando estão localizadas nas extremidades distais dos membros, pois requerem tratamentos mais intensivos e caros (THEORET, 2006). As lesões cutâneas podem ter como causa: perfurações; contusões; abrasões; incisões e lacerações que normalmente estão relacionadas a traumas. Contudo, outros tipos de lesões relacionadas a presença de patógenos e de neoplasias também podem acometer estes animais (RIBAS et al., 2005), sendo que em todas as causas citadas acima, existem fatores relacionados diretamente no processo de cicatrização tais como: tamanho da lesão, tensão, mobilidade, falta de sangue e suscetibilidade à infecção (KIM; PARK, 2009).

As lacerações nas extremidades distais dos membros normalmente apresentam um lento processo de cicatrização associado ao desenvolvimento exuberante do tecido de granulação, e essas lesões são uma preocupação importante para os proprietários de cavalos e veterinários (SANCHES et al., 2007). A cicatrização de feridas é um processo muito complexo que envolve a organização de células por meio de sinais químicos gerando uma remodelação da matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesionado. Após uma lesão, ocorre uma sequência coordenada de células e eventos moleculares para a reconstituição do tecido lesionado. Este processo é caracterizado por três fases que se

sobrepõem e apresentam características específicas: a fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; MARTELLI et al., 2016).

Outros tipos de lesões que acometem o sistema tegumentar são as que ocorrem nos cascos, que podem consequentemente causar a laminite. Esta, por sua vez, pode causar complicações anatômicas progressivas resultando em ruptura da comunicação da falange distal e elementos cutâneos da parede lamelar da úngula (ENGILES, 2010). Estas alterações causam mudanças degenerativas, claudicação, anormalidades da postura, ocasionando em muitas vezes a necessidade de eutanásia nos animais (WYLIE et al., 2011)

O conhecimento sobre as características do sistema tegumentar de equinos adultos já é bem descrito, uma vez que, isso é necessário para a compreensão do padrão normal a ser seguido diante das alterações patológicas existentes (HAMRICK, 2003; OBAYES, 2016). Contudo, os estudos relacionados ao desenvolvimento são importantes para o estabelecimento de padrões anátomo-embriológicos-fetais para cada espécie, obtendo maiores informações e esclarecimentos quanto a seus mecanismos fisiológicos (COHEN et al., 2004; BARRETO et al., 2016).

Sabendo da importância do estudo da organogênese para funcionalidade deste sistema, e em decorrência da escassez de dados na literatura sobre o desenvolvimento da pele e dos anexos de natureza córnea, o objetivo deste trabalho foi descrever as características morfológicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de equinos

4.2 MATERIAL E METODO

4.2.1 ANIMAIS

As amostras (n=40) se encontravam no acervo do laboratório de Anatomia Morfológica e de Desenvolvimento Embrionário da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), as quais foram coletadas previamente em abatedouros, sob aprovação do comitê de ética da FMVZ-USP (nº 1475/2008).

4.2.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS

Para a descrição macroscópica foram coletados embriões e fetos equinos, dos quais, os períodos gestacionais foram estimados segundo metodologia preconizada por Evans & Sack (1973), que se baseia na mensuração da distância da crista nugal até a última vértebra sacral (Crown-Rump - CR) associado a análise das características externas. Em seguida as amostras foram subdivididas em dois grupos de acordo com sua idade gestacional. O grupo I correspondeu ao intervalo de 20 a 36 dias gestacionais e o grupo II correspondeu ao intervalo de 40 a 75 dias gestacionais.

4.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras foram fixadas em paraformaldeído por 48 horas. Em seguida, desidratadas em diferentes concentrações de álcool por 30 minutos (álcool 50%, 70%, 80%, 95%, 100%), seguido de desidratações a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

4.2.4 MICROSCOPIA DE LUZ DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS

Para realizar a descrição microscópica foram coletados fragmentos de pele em diferentes regiões corpóreas de embriões e fetos equinos, sendo estas: cabeça, regiões dorsal e abdominal, glândulas mamárias e casco, posteriormente processado para análise histológica. As amostras coletadas destas regiões foram fixadas em formaldeído 10% durante 48h. Após fixação, as amostras foram desidratadas em uma série de etanóis (70% a 100%), seguido da diafanização em xilol e inclusão em parafina (TOLOSA et al, 2003). Posteriormente os blocos foram cortados em micrótomo para coloração de Hematoxilina Eosina (HE) e Tricromo de Masson. Em seguida o material foi analisado em microscópio Olympus BX40 (Zeiss KS400).

4.2.5 IMUNOHISTOQUIMICA DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EMBRIÕES E FETOS DE EQUINOS PARA CITOQUERATINA 18 E COLÁGENO I

As amostras foram submetidas à técnica de imunohistoquímica, utilizando os seguintes anticorpos primários: Citoqueratina-18 (sc-32329), colágeno I (Rockland 600-401-103S) e GFAP (sc-33673). A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito por OLIVEIRA et al., (2012). O controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (Goat anti-Mouse IgG – AP 308F, 116 Chemical International).

4.3. RESULTADOS

4.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE EMBRIÕES E FETOS

Foram descritos dois grupos, sendo o grupo I composto por embriões com período gestacional entre 20 a 36 dias, e o grupo II composto por fetos com período gestacional entre 40 a 75 dias. Para ambos os grupos foram descritos os dados

biométricos referentes ao peso e ao Crown-rump (Tabela 2), e as principais características morfológicas.

Tabela 2: Dados biométricos de embriões e fetos equinos (*Equus caballus*), São Paulo, 2018

Períodos Gestacionais	Dias	Média do Peso (g)	Média do CR (Cm)
Embriões Grupo I	20	0,01	0,06
	24	0,2	1,1
	26	0,3	1,3
	36	0,35	1,4
Fetos Grupo II	40	10,0	5,1
	50	7,63	5,16
	52	7,9	5,4
	60	10,36	5,7
	62	15,1	6,3
	63	20,1	7,0
	65	21,2	8,2
	69	38,3	9,1
	75	44,0	9,25

Grupo I

Os embriões com 20 dias gestacionais possuíam formato de “C” com uma curvatura cervical bem pronunciada, apresentando a região cranial em desenvolvimento, estando esta subdividida em três cavidades encefálicas: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Nestes animais era possível observar a divisão do corpo em somitos em desenvolvimento. A cauda apresentava de aspecto alongada, com formato cilíndrico e espessura muito similar a do restante do corpo do embrião (Figura 4A). Os embriões com 24 dias apresentavam a região da cabeça mais desenvolvida, com início de pigmentação da retina e subdivisão da região encefálica em três vesículas, além de apresentarem o início da formação da região cardíaca (Figura 4B). Ainda nesta idade os brotos dos membros torácico e pélvico estavam em formato de remo (Figura 4C e D). Com 26 dias apresentavam a retina mais pigmentada e região hepática presente (Figura 4E), com o membro torácico e pélvico mais alongado com início da formação do casco (Figura 4 F). Por fim aos 36 dias gestacionais, os embriões já se encontravam com todas as características citadas nas idades anteriores, diferindo apenas em seu tamanho, o qual possuía uma forma mais alongada devido ao seu desenvolvimento.

Figura 4: Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de embriões equinos com idades estimadas de 20 a 36 dias

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Em (A): embrião com 20 dias, evidenciando o formato em “C”. Em (B, C e D): embrião com 24 dias, evidenciando as características externas (B), os brotos dos membros torácico (C) e pélvico (D); Em (E): embrião com 26 dias; F: embrião com 36 dias, evidenciando a mudança na conformação do membro torácico. Notar: s: somitos, p: prosencéfalo; m: mesencéfalo, rh: rombencéfalo, op: vesícula optica; pr: retina pigmentada; tm: membro torácico; pm: membro pélvico; he: região hepática; ce: eminência caudal

Grupo II

Neste grupo, começaram a surgir as características que definem esta espécie. Aos 40 dias, os animais possuíam a cavidade oral bem desenvolvida e região hepática evidente. Outras características observadas foram: retina pigmentada, membros em desenvolvimento com aparelho ungueal evidente e a

cauda eminente, além de apresentarem uma pele translúcida (Figura 5A). Aos 50 dias, os fetos apresentaram pele parcialmente translúcida, pois ainda era possível visualizar algumas estruturas como região hepática e vasos. Todos os fetos encontravam-se de formato alongado, com a região da face desenvolvida. Neste momento a membrana óptica recobria grande parte ou totalmente a retina de formato discoide e já pigmentada. A pálpebra já se apresentava fundida (Figura 5B). O casco em formação apresentava aspecto cuneiforme (Figura 5C). Na vista lateral notou-se o início da delimitação da derme coronária. Em sua vista palmar, encontravam-se a sola e a ranilha. A sola de formato semilunar apresentava uma superfície ventral côncava e a ranilha possuía formato de uma pirâmide bem pronunciada com o sulco lateral e sulco central da ranilha delimitados (Figura 5D). A partir da microscopia eletrônica de varredura observou-se que a superfície dermal do início da formação do cório coronário era de aspecto poroso (Figura 5E).

Figura 5: Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de fetos equinos com idades estimadas de 40 a 50 dias

Fonte: (ANUNCIACÃO, 2019)

Legenda: Em (A): feto com 40 dias gestacionais; (B): feto com 50 dias gestacionais; (C): vista lateral do casco de feto com 50 dias gestacionais; (D): vista palmar do casco de feto equino com 50 dias gestacionais; (E): Microscopia eletrônica de varredura do casco equino com 50 dias gestacionais. Notar: pr: retina pigmentada; tm: membro torácico; pm: membro

pélvico; he: região hepática; ce: eminência caudal, c: casco, p: pálpebra, 1-pinça, 2- derme coronária, 3-talão, 4-bulbo do talão, 5-sola, 6-ranilha, (seta azul) sulco lateral da ranilha, (seta vermelha) sulco central da ranilha.

Aos 52 dias gestacionais, foi possível identificar folículos pilosos emergindo na região mandibular e maxilar (Figura 6A e B). Alguns folículos pilosos já apresentavam pelo tátil aparente. Outra característica observada nesta idade foi a vascularização da pele na região abdominal e um par de glândulas mamárias evidentes, localizadas na região infra-umbilical, paralelamente distribuídas (Figura 6C).

Aos 60 dias, a pele dos fetos se tornou espessa e de aspecto opaco (Figura 3D), o bulbo do talão demonstrava aspecto evidente, e a ranilha mais desenvolvida do que nas idades anteriores, evidenciava seus sulcos lateral e central mais pronunciados (Figura 6E e F). A partir da microscopia eletrônica de varredura observou-se que a superfície dermal do cório coronário era constituída de ondulações dérmicas que posteriormente irão se transformar em papilas dérmicas (Figura 6G).

Aos 69 dias a pele apresentava-se espessa e opaca. Os folículos pilosos encontravam-se bem distribuídos (Figura 6H). Quanto ao casco, na vista palmar notou-se o bulbo do talão mais proeminente (Figura 6I). A partir dessa idade não houve modificações morfológicas relevantes quando comparadas as demais idades, sendo caracterizadas somente pelo crescimento das estruturas.

Figura 6: Características macroscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de fetos equinos com idades estimadas de 52 a 69 dias

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: (A): feto com 52 dias gestacionais; (B): presença de folículos pilosos em feto com 52 dias gestacionais; (C): glândulas mamárias em feto com 52 dias gestacionais; (D): características macroscópicas de feto equino com 60 dias gestacionais; (E): vista lateral do casco de feto equino com 60 dias gestacionais; (F): vista palmar de casco equino com 62 dias gestacionais; (G): Microscopia eletrônica de varredura do casco equino com 60 dias gestacionais; (H): Microscopia eletrônica de varredura de feto equino com 69 dias gestacionais. Notar: hf: folículo piloso, b: boca, tm: membro

torácico, c: casco, mg: glândula mamária, uc: cordão umbilical, ce: eminência caudal, 1-pinça, 2-derme coronária, 3-talão, 4-bulbo do talão, 5-sola, 6-ranilha, (seta azul) sulco lateral da ranilha, (seta vermelha) sulco central da ranilha

4.3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Aos 20 dias gestacionais a pele de diferentes regiões corpóreas analisadas encontrava-se indiferenciada (Figura 7A). Com 24 e 26 dias gestacionais foram evidenciadas diferenças no desenvolvimento da pele nas regiões corpóreas analisadas, sendo que na região da cabeça, ela era formada por uma fina camada de células achatadas e um tecido conjuntivo logo abaixo (Figura 7B). Entretanto, na região dorsal notou-se um espessamento celular com início de estratificação (Figura 7C). Aos 36 dias gestacionais foram evidenciados na região da cabeça duas camadas da pele, sendo: a epiderme mais organizada quando comparado à idade anterior, onde se verificava maior estratificação e núcleos mais individualizados. A derme apresentava vasos sanguíneos (Figura 7D); entretanto, na região abdominal e dorsal eram notáveis duas camadas de células, porém a camada superficial não estava tão organizada quanto aquela encontrada na região da cabeça (Figura 7E).

Aos 40 dias já era possível distinguir duas camadas: a epiderme e derme. A epiderme era constituída por uma camada córnea, uma camada espinhosa e uma camada basal. As camadas da derme - camada papilar e camada reticular - eram de difícil distinção. Na região da face havia folículos pilosos (Figura 7F). Nesta mesma idade, ao analisar o casco, não foi possível identificar a divisão em três estratos (Figura 7G).

Nos fetos com 50 dias, o casco já apresentava a delimitação do estrato externo, estrato médio e interno. O estrato externo era constituído por uma camada de colágeno facilmente distinta pela coloração Tricomio de Masson. O estrato médio era formado por um epitélio colunar, com células arredondadas de núcleo centralizado, sendo estas células precursoras dos futuros túbulos córneos. O estrato interno era constituído por um epitélio pavimentoso, porém ainda não era possível distinguir as lamelas epidérmicas primárias e secundárias (Figura 7H).

Com 52 dias gestacionais, a pele já estava com todas suas camadas diferenciadas. Em relação aos anexos cutâneos, a partir deste período, ocorreu o surgimento microscópico do tecido mamário primordial sendo este constituído por ductos lactíferos (Figura 7I). Com relação ao casco, este não se encontrava totalmente formado, mantendo as mesmas características já descritas até os 75 dias gestacionais sendo esta a última idade gestacional analisada

Figura 7: Características microscópicas do desenvolvimento do sistema tegumentar de embriões e fetos equinos com idades estimadas de 20 a 52 dias

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Em (A) feto de equino com 20 dias gestacionais; (B e C) feto de equino com 26 dias gestacionais; (D e E) feto de equino com 36 dias gestacionais, em círculo observar o núcleo da célula; (F e G) feto de equino com 40 dias gestacionais; (H) feto de equino com 50 dias gestacionais e (I) feto de equino com 52 dias gestacionais. Notar: Ep-epiderme, M-mesênquima, Bl-camada basal, El-camada espinhosa, *-camada granulosa e lucida indiferenciada, Seta-camada córnea, fm- falange média, fd-falange distal, Ee- estrato externo, Em- estrato médio, Ei- estrato interno, DI-ductos lactíferos.

4.3.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE ESTRUTURAS DO SISTEMA TEGUMENTAR DE EQUINOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

As análises imunohistoquímicas foram realizadas em amostras de embriões e fetos, com o intuito de avaliar a presença das proteínas relacionadas à formação dos constituintes da pele e do casco. Foi observada a marcação positiva da proteína citoqueratina (CK-18) no citoplasma do tecido epidermal em formação nas amostras de embriões com 20 dias gestacionais e no extrato externo do casco em fetos com 50 dias gestacionais (Figura 8A-B).

Também foi observada a expressão da proteína GFAP no citoplasma celular das amostras de embriões, o que demonstrou a presença de receptores sensoriais no início do desenvolvimento da pele (Figura 8C). O colágeno I, proteína presente na matriz extracelular, também estava expresso no citoplasma de embriões equinos durante a diferenciação da pele (Figura 8D).

Figura 8: Análise de Imunohistoquímica do sistema tegumentar de embriões e fetos equinos

Fonte: (ANUNCIACÃO, 2019)

Legenda: Em (A): marcação de citoqueratina na pele; (B): marcação de citoqueratina no casco; (C): marcação de GfAP; (D): marcação de colágeno I.

4.4. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do sistema tegumentar de equinos, as células epidérmicas da pele se dividem rapidamente e se estratificam em um epitélio de múltiplas camadas (VELTRI et al., 2018). Já é conhecido que nos animais a pele é derivada da ectoderme dando origem a epiderme e seus anexos e da mesodermes, as quais se diferenciam nos componentes da derme (ACKERMAN, 1997). Entretanto, cada espécie apresenta um período distinto de formação da pele (LUCHLER; FUCHS, 2005). Neste trabalho evidenciamos que a diferenciação da

pele em epiderme e derme ocorreu de forma desigual nas diferentes regiões do corpo do embrião de equino. O início da estratificação da epiderme ocorreu inicialmente na região da cabeça, resultados que se somam aos descritos por TOMMASI JUNIOR et al., (2014), os quais relataram que a estratificação da epiderme ocorreu em regiões diferentes de fetos bovinos no mesmo período gestacional. Esta diferença no processo de estratificação da epiderme pode estar relacionada com os processos de sinalização entre a epiderme e a derme (WILSON et al., 2001).

Outra característica observada foi a presença da diferenciação entre as duas camadas da pele durante o período embrionário, sendo observado aos 36 dias gestacionais nos equinos. Porém as subcamadas, presentes na epiderme e derme ainda não foram evidenciadas nesta idade gestacional. Apenas foi notável a presença de muitos vasos sanguíneos na camada dérmica. Estes vasos são de extrema importância para a irrigação e nutrição da camada epidérmica (GERSON et al., 2011), a qual apresenta uma importante função nos mecanismos de proteção do organismo, criando uma barreira entre o meio externo e interno. A camada mais superficial da epiderme, é altamente queratinizada, proporcionando uma maior proteção contra desidratação e também contra atritos. Na presença de agentes agressores, estas liberam mediadores químicos, os quais produzem mudanças estruturais no tecido, combatendo assim os agentes agressores (DICKEL et al., 2002).

O desenvolvimento da epiderme inclui a formação dos apêndices epidérmicos como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Durante a diferenciação dos tecidos, as células da camada basal da epiderme invaginam na derme para formar os apêndices do folículo piloso. Seu desenvolvimento é importante para a biologia da pele, pois são responsáveis pela produção de pelos, os quais são essenciais para a termorregulação e na percepção sensorial (MILAR, 2002). Além disso, os folículos pilosos são auto renováveis e contêm reservatórios de células tronco multipotentes, ou seja, podem ser utilizados em terapias para auxiliar no processo de cicatrização de feridas (TOMMASI JUNIOR, 2017). Neste estudo foi comprovado o início da formação dos folículos pilosos aos 52 dias

gestacionais, informação que pode ser muito útil em futuros trabalhos sobre obtenção de células tronco a partir dos anexos cutâneos.

O desenvolvimento da estratificação dérmica também ocorreu aos 52 dias gestacionais. Nesta fase foi evidenciada a divisão da derme em camada papilar, a qual apresenta uma importante função na transferência de nutrientes para a epiderme. A camada reticular, mais profunda da derme, a qual oferece subsídios para a sustentação deste tecido (GERSON et al., 2011)

Outra estrutura que se desenvolveu no período fetal foi a glândula mamária. Esta por sua vez, é considerada uma glândula sudorípara especializada que surge a partir da crista mamária na superfície ventral do embrião (HYTEL, 2012). O fato de seu surgimento ocorrer no período fetal em equinos está de acordo com Hytel (2012), o qual relatou que em equinos o surgimento da glândula mamaria é mais tardio em comparação aos demais mamíferos. É importante salientar que este tecido é exclusivo dos mamíferos e que sua principal função está na nutrição dos neonatos oferecendo assim uma maior chance de sobrevivência pelo cuidado parental desses indivíduos (HARA et al., 2018).

Outra característica adaptativa dos mamíferos são os apêndices queratinizados nas pontas dos dígitos, dos quais refletem funcionalmente as adaptações alcançadas por estes indivíduos para sobreviver em diferentes ambientes (HAMRICK, 2003). Neste trabalho, evidenciamos o início da formação do casco até o surgimento de suas principais estruturas como por exemplo a presença da ranilha. Essa estrutura é de grande importância para a locomoção dos equinos adultos, pois auxilia no processo de amortecimento de impactos do peso quando apoiados no solo, bem como na irrigação sanguínea para o interior do casco (GORISSEN et al., 2018). Outra estrutura importante na locomoção dos equinos são os talões, os quais também permitem que os cascos resistam ao impacto do peso durante sua biomecânica (GORISSEN et al., 2018).

A resistência mecânica do casco depende da queratinização das células nas camadas germinais da epiderme, da integridade das interações célula-célula e na organização macromolecular de filamentos de queratina no interior desta matriz (FRASER E MCCRAE, 1980; HENDRY, 1995). Neste trabalho evidenciamos a marcação positiva para a proteína citoqueratina 18, que é uma proteína de filamento

intermediário, a qual foi expressa no início da formação da pele e do casco. Este resultado demonstra o quanto esta proteína é essencial no desenvolvimento e diferenciação da pele e seus anexos, pois de acordo com Kirfela et al., (2003) a sua principal função é transmitir resistência mecânica das células e suas funções adicionais incluem a sua participação na resposta ao estresse, sinalização celular e apoptose.

Outro filamento intermediário de proteína expresso durante a diferenciação da pele foi o GFAP, o qual demonstrou a presença de receptores sensoriais na derme. A presença de terminações nervosas na derme constitui um importante fator no mecanismo de percepção dos fatores ambientais de pressão, temperatura e dor, aos quais mantem íntima relação com os folículos pilosos (HALATA, 1993; SOUZA et al., 2009).

Além das proteínas citadas acima, outra proteína importante é o colágeno, tendo a sua principal função associada ao suporte e manutenção da integridade estrutural, fornecendo textura ao tecido, além de ter um papel regulador no desenvolvimento dos tecidos, ou seja, é um constituinte significativo na matriz extracelular e sua presença no início do desenvolvimento da pele ressalta a sua participação como estruturante durante a diferenciação celular (TANGSADTHAKUN et al., 2017 ; COELHO et al., 2017; FERTALA et al., 2016; FRATZL et al., 1998).

O estudo da morfologia da pele e seus anexos em animais adultos são bem descritos e contribuem para a compreensão de lesões na pele e no estudo da biomecânica do casco de equinos. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos que relatam o desenvolvimento dos anexos cutâneos (BRAGULLA et al., 2003). Nesta pesquisa evidenciamos o surgimento do broto torácico e pélvico até a estratificação do casco, o qual pode ser usado em estudos de defeitos congênitos do casco, para o entendimento de doenças, lesões e para a compreensão da biomecânica dos membros torácicos e pélvicos de equinos

4.5. CONCLUSÃO

Desta forma, foi evidenciado diferenças importantes ao longo da transição do desenvolvimento embrionário/fetal. Verificou-se que na fase embrionária ocorreu diferenças no desenvolvimento da epiderme ao longo das regiões corpóreas, contudo fetos a partir de 40 dias apresentavam diferenciação da epiderme e derme, bem como na formação do casco, o qual aos 52 dias já apresentava suas estratificações delimitadas.

4.6 REFERÊNCIAS

- Barreto, R D. S. N., Rodrigues, M. N., Carvalho, R. C., de oliveira, E. S., Menezes, F., Rigoglio, N. N., Miglino, M. A. Organogenesis of the Musculoskeletal System in Horse Embryos and Early Fetuses. *The Anatomical Record*, v. 299, n.6, 722-729, 2016
- Barreto, R. D. S. N., Romagnolli, P., Mess, A. M., Miglino, M. A. Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 12, n. 4. 2018.
- Bragulla, H. Fetal development of the segment-specific papillary body in the equine hoof. *Journal of morphology*, v. 258, n. 2, p. 207-224, 2003.
- Cohen S.G., Zelaya-Quesada M. Prausnitz and Küstner phenomenon: the P-K reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.114, p. 705– 710, 2004.
- Couto, J. P. A., Nicolau, R. A., Munin, E., Castillo, M. A. S., & Fadin, P. S. Skin Tissue Healing Induced by Coherent (Laser) or Non-Coherent (LED) Light Therapy on Aged Rats. *Int Phys Med Rehab J*, v.1, n. 5, 2017.
- Dai, J., Choo, M. K., Park, J. M., & Fisher, D. E. Topical ROR Inverse Agonists Suppress Inflammation in Mouse Models of Atopic Dermatitis and Acute Irritant Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(12), 2523-2531, 2017.
- de Oliveira, V. L., Keijsers, R. R., van de Kerkhof, P. C., Seyger, M. M., Fasse, E., Svensson, L., & van Erp, P. E. Humanized mouse model of skin inflammation is characterized by disturbed keratinocyte differentiation and influx of IL-17A producing T cells. *PloS one*, v.7, n.10, 2012.
- Dyhre-Poulsen P; Smedegaard HH, Roed J; Korsgaard E. Equine hoof function investigated by pressure transducers inside the hoof and accederometers mounted on the first phalanx. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, p.362-366, 1994.
- Engiles, J. B. Pathology of the distal phalanx in equine laminitis: more than just skin deep. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v. 26, n. 1, p. 155-165, 2010.
- Engler A. J, Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, v.126, p.677–89, 2006.

Ferraro, G. L.; Meierhenry, B. Glide, K. Osburn, B. I. Equine dermatology: everything you wanted to know (and more) about skin. Center for Equine Health, UC Davis School of *Veterinary Medicine*. v. 24, n. 1, p.1-3, 2006.

Fertala, A., D Shah, M., A Hoffman, R., & V Arnold, W. Designing Recombinant Collagens for Biomedical Applications. *Current Tissue Engineering*, v.5(2), 73-84, 2016.

FILIP, S.; ENGLISH, D.; MOKRÝ, J. Issues in stem cell plasticity. *J Cell Mol Med*. v. 8, n. 4, p. 572– 577, 2004.

FORNI, M. F., TROMBETTA-LIMA, M., SOGAYAR, M. C. Stem cells in embryonic skin development. *Biological research*, 45(3), 215-222, 2012.

FRASER R. D. B, MCCRAE T.P Molecular structure and mechanical properties of keratins. In: Vincent JF, Currey JD (eds) The mechanical properties of biological materials. Cambridge University Press, Cambridge, pp 211–246, 1980
Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., & Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *Journal of structural biology*, v. 122, n.2, p.119-122.

GORISSEN, B. M. C., Serra Bragança, F. M., Wolschrijn, C. F., Back, W., & van Weeren, P. R. The development of hoof balance and landing preference in the post-natal period. *Equine Veterinary Journal*, 50. 809–817, 2018.

HALATA, Z. Sensory innervation of the hairy skin (light-and electronmicroscopic study). *Journal of investigative dermatology*, v. 101, n. 1, p. S75-S81,1993.

HAMRICK, M W. (2001). Development and evolution of the mammalian limb: adaptive diversification of nails, hooves, and claws. *Evolution & Development*, v. 3, n. 5, p. 355-363.

HENDRY, K. A. K., Lancelott, M. J., Knight, C. H., Kempson, S. A., & Wilde, C. J. (1995). Protein synthesis in tissues cultured from the bovine hoof. *Cell and tissue research*, v. 281, n.1, p. 93-99.

KIRFEL, J.; MAGIN, T. M.; REICHEL, J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 60, n. 1, p. 56-71, 2003.

LECHLER, T; FUCHS, E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, v. 437, n. 7056, p. 275, 2005.

Martelli, A.; Theodoro, V.; Zaniboni, V. E.; DE Freitas, B. A.; Pastre, G. M.; DE Melo, K. M.; DE Andrade, T. A. M.; DOS Santos, G. M. T. Microcorrente no processo de cicatrização: revisão da literatura. *Archives Of Health Investigation*, v. 5, n. 3, 2016.

MENDONÇA, R. J. D.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

Millar, S. E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. (2002). *Journal of Investigative Dermatol.* v.118, n.2, p216-25.

Obayes, A. K. Histological study for skin of horse. *Tikrit Journal of Pure Science*, V21, N.1, 2016.

RIBAS L.M, NOGUEIRA C.E.W, BEIRA F.T.A, ALBUQUERQUE L.P.A.N, KICKHÖFEL I. A . Efeito cicatrizante do extrato aquoso de *Triticum vulgare* em feridas do tecido cutâneo de equinos. *A Hora Veterinária*, Ano 25, 147, 2005.
SCOTT D.W, MILLER W.H. Environmental skin diseases. In: Scott DW, Miller WH, editors. *Equine dermatology*. 2nd ed., St Louis: Saunders. p. 600–627, 2011.

SILVA, M.L. Sistema Tegumentar. Laboratório de Ornitologia e Bioacústica, Universidade Federal do Pará, Pará, 2005.

SOUZA T.M., FIGHERA R.A., KOMMERS G.D. & BARROS C.S.L. Histological aspects of canine and feline skin as a tool for dermatopathology. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(2):177-190, 2009.

TANGSADTHAKUN, C., KANOKPANONT, S., SANCHAVANAKIT, N., BANAPRASERT, T., & DAMRONGSAKKUL, S. Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 16(1), 2017.

THEORET, C. Tissue engineering in wound repair: the three "R"s--repair, replace, regenerate. *Veterinary surgery*. v. 38, 905-913, 2009.

THEORET, C., STASHAK, T. Equine Wound Management - Chapter 8 - Wounds of the Distal Extremities. 2nd Ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 373-445, 2008.

TOMMASI JUNIOR, H. L., FAVARON, P. O., RODRIGUES, R. F., GUIMARÃES, J. P., MIGLINO, M. A. Development of the integumentary system in bovine with estimated gestational ages from 20 to 140 days. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.7, 695-702, 2014.

TOMMASI, H.L.P. DURVANEI, A. M , MESS, A M , GIORGI, R.R , CONSUELO, R. J. C.R , MIGLINO, M.A. Characterization of Cell Lineages Derived From Tactile Hair Follicles of Dog Fetuses. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, v.4, n.7, 2017.

VELTRI, A., LANG, C., & LIEN, W. H. Concise Review: Wnt Signaling Pathways in Skin *Development and Epidermal Stem Cells*. *Stem Cells*, V.36, p. 22-35, 2018.

WILSON, S. I; RYDSTRÖM A; TRIMBORN T; WILLERT K; NUSSE R; JESSELL TM; EDLUND T. The status of wnt sig-nalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature*, v. 411, n.6835, p. 325-30, 2001.

WYLIE, C. E., COLLINS, S. N., VERHEYEN, K. L., NEWTON, J. R. Risk factors for equine laminitis: a case-control study conducted in veterinary-registered horses and ponies in Great Britain between 2009 and 2011. *The Veterinary Journal*, 198(1), 57-69, 2013.

5 CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE FIBROBLASTOS DA DERME DO CAVALO “BAIXADEIRO” PARA A CONSTITUIÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA

Resumo

O cavalo “Baixadeiro” é um ecotipo equino que vive em áreas alagadas da Baixada Maranhense- MA, sendo resistente ao clima da região. A população desses animais vem diminuindo em decorrência dos cruzamentos com outras raças, o que pode levar ao desaparecimento deste grupamento racial. Dessa forma, propôs-se isolar e caracterizar os fibroblastos da derme do cavalo Baixadeiro para a conservação de material genético. Amostras de pele foram coletadas de 8 animais entre machos e fêmeas, as quais foram cultivadas em 3 meios diferentes DMEM/F12, MEM/Alpha e DMEM-High Glucose todos suplementados com 15% de SFB. Foram realizados a análise morfológica, detecção de mycoplasma, curva de crescimento, teste de viabilidade celular, avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico-MTT e imunofenotipagem. As células apresentaram citoplasma alongado e núcleo esférico centralizado com alta capacidade de expansão e rápida proliferação de 24 até 72 horas, sendo o melhor meio para o cultivo celular o DMEM/F12. A imunofenotipagem mostrou marcação para células tronco mesenquimais. Dessa forma, é possível a criação de um banco de linhagens celulares do cavalo Baixadeiro para a conservação genética contribuindo assim para a preservação das características de adaptação destes animais.

Palavras-Chave: preservação genética, célula-tronco, equinos

5.1 INTRODUÇÃO

O cavalo “Baixadeiro” é um grupo de cruzamento centenário restrito a região da Baixada Maranhense (FERREIRA, 2016). São animais com alto potencial de resistência ao clima típico da região (GAZOLLA, 2015) (CHAVES, 2015). Sua origem não é totalmente esclarecida, sabe-se que são oriundos do cruzamento de equinos de origem Ibérica, que foram introduzidos no Brasil no período colonial, provavelmente dos cavalos Garrano e Berbere (CHUNG et al, 2015). Este grupamento racial exerce importante função social, uma vez que auxiliam a população da Baixada Maranhense que vive da pecuária e da agricultura familiar, a exemplo do que ocorre no Pantanal Mato-Grossense com o cavalo Pantaneiro, em Roraima com Lavradeiro e no Pará com o Marajoara, os quais também possuem importância social e econômica em suas regiões (SERRA, 2004).

A população de cavalos Baixadeiros vem reduzindo em decorrência dos cruzamentos indiscriminados com outras raças, o que pode levar à descaracterização ou ao desaparecimento deste grupamento racial (SERRA, 2004). Portanto, há uma necessidade urgente de iniciar a conservação destes animais, pois os equinos bem adaptados ao seu ambiente dispõem de recursos fisiológicos e morfológicos que os habilita a enfrentar as restrições do meio ambiente com êxito (EGITO, 2002) (FRANDSON, 2005).

Em decorrência da necessidade de conservação de ecotipos localmente adaptados, diversas pesquisas vêm sendo realizadas nesta área. Sabe-se que a conservação de animais pode ocorrer de diferentes formas: por meio de sêmen, embriões, banco genômico e banco de cDNA. Uma outra fonte de recurso para pesquisas visando a conservação de materiais genéticos é o uso de bancos de germoplasma a partir do isolamento e cultivo de fibroblastos, o que é uma técnica fácil e de baixo custo (GIBSON, 2006) (X.C. LI 2009), (MOREIRA et al., 2016; ALBUQUERQUE, 2016). Dessa forma, é possível a manutenção da diversidade genética que é fundamental para seu melhoramento sustentável, pois não é

possível prever quais características poderão ser necessárias no futuro para o sistema de produção (MAKKAR; VILJOEN, 2005) (HALL SJG, 2015).

Dessa forma, o estabelecimento de bancos de fibroblastos para o cavalo Baixadeiro sustenta a proposta de finalidade prática, no sentido de preservar material genético.

5.2 MATERIAL E MÉTODO

5. 2.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 8 cavalos Baixadeiros adultos de aproximadamente cinco anos de idade (2 Machos e 6 fêmeas), os quais foram obtidos de propriedades particulares da Baixada Maranhense na cidade de Pinheiro, Maranhão, Brasil. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUA nº 8783120716).

5.2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE EQUINOS

De cada animal realizou-se a biopsia de pele da região cervical após anestesia local por infiltração de xilocaína 2%. Foram coletadas oito amostras de pele (cerca de 1 cm²) da região cervical sob condições estéreis, sendo lavadas 3 vezes com solução tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de penicilina e estreptomicina, depois as amostras foram cortadas em pequenos pedaços (1 mm³) e cultivadas utilizando a técnica de explante primário (FRESHNEY et al., 2000). Estas amostras foram cultivadas em 3 meios diferentes: DMEM/F12 (BR30004-05; LGC Biotecnologia), MEM/Alpha (BR3007-05, LGC Biotecnologia) e DMEM-High Glucose (BR30003-05;

LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), todos suplementados com 15% de soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato de sódio (Sigma, Cat. S8636, St. Louis, Mo. USA), 1% de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01). As placas foram mantidas em incubadora a temperatura de 38,5°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

5. 2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FIBROBLASTOS

Para a análise morfológica dos fibroblastos, as amostras foram avaliadas a cada dois dias por meio de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). As células foram avaliadas antes e após o congelamento.

5. 2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FIBROBLASTOS

Foram plaqueadas 1.10^4 células sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após a aderência nas lamínulas, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, lavadas em solução tampão fosfato salina (PBS) a 0,1 M pH 7,4 e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguindo de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim as mesmas foram desidratadas a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente, as amostras foram colocadas em suporte metálico para revestimento em ouro ("Sputtering" Emitech k550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

5. 2.5 TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA

Para detecção da presença de micoplasmas nas culturas celulares foi realizado o teste por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) baseado em Uemori et al. (Uemori T et al. (1992)). As células foram cultivadas por 4 dias em meio DMEM/F12, MEM/Alpha e DMEM-High Glucose suplementado com 15% SFB e sem antibióticos, até atingirem confluência. Para o PCR foram utilizados 2uL do meio de cultivo. O produto de reação desta primeira reação foi utilizado como molde para o segundo PCR (Nested PCR), a fim de evitar amplificações inespecíficas. Para as reações foi utilizada a Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific). Como controle negativo foi utilizado uma reação sem o material a ser testado e como controle positivo, um meio de cultura coletado de células contaminadas com micoplasma. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta no equipamento ImageQuant LAS 4000 e comparados ao marcador de peso molecular de 100 pares de base (Sinapse Inc).

5. 2.6 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS

Células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade aproximada de 2×10^4 células por poço, cultivadas durante quatro dias e contados todos os dias no intervalo de 24, 48, 72 e 96h (3 poços cada vez) para determinar o número de células e o melhor tempo de duplicação da população (PDT) (MEHRABANI et al., 2014).

5. 2.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DOS FIBROBLASTOS

As células foram congeladas usando 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO e posteriormente armazenadas em freezer -80°C. Posteriormente a viabilidade celular foi determinada utilizando coloração azul de tripan (0,4% de azul de tripan em PBS) como descrito anteriormente (Na et al., 2010). Todas as quatro amostras se encontravam na passagem 4 (P4) O número de células mortas foi determinado a partir de um campo de 1000 células.

5. 2.8 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT DOS FIBROBLASTOS

Para a realização do ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico 1×10^3 células na passagem 4 foram plaqueadas em placas de 96 poços em três meios: DMEM/F12, MEM/Alpha e DMEM-High Glucose. O experimento foi realizado conforme descrito por Borghesi et al (2017) e a leitura da absorbância foi de 490 nm usando um espectrofotômetro (MQuant–Bio Tek Instruments, VT, USA).

5. 2.9 IMUNOCITOQUÍMICA DOS FIBROBLASTOS

Foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de 24 poços, as quais continham lamínula de vidro. Quando as células atingiram confluência de 80% todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS e acrescentado paraformaldeído 4% por 30 minutos. Posteriormente iniciou-se o protocolo de imunocitoquímica, o qual foi previamente estabelecido por Santos et al., (2017). Os anticorpos primários foram: Tra-1 (sc21706, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe); Vimentina (ab92547, Abcam, Cambridge, UK), Oct-4 (ab181557, Abcam Cambridge, UK), CD-34, CD-105 e finalmente os anticorpos conjugados CD117 (mab1162F Chemicon®) e CD90 (ab225, Cambridge, UK.) diluídos em PBS na proporção de 1:50

5.3 *RESULTADOS*

5.3.1 ISOLAMENTO E MORFOLOGIA CELULAR

Em todos os meios testados o explante demorou em média 24 h para começar a aderir e a soltar células. Foi verificado que no meio DMEM-F12 em média no terceiro dia de cultivo as células atingiram confluência de 80%, sendo possível expandi-las. Ao contrário dos demais meios de cultivo, nos quais, as células demoraram cerca seis dias para atingir esta mesma confluência, demonstrando dessa maneira a eficácia do DMEM-F12 sobre essas células.

Por meio da análise morfológica foi possível verificar que as células apresentaram aspecto alongado, núcleo esférico e centralizado semelhante a morfologia fibroblastoide (Figura 9A-C).

5.3.2 ANÁLISE DE MICOPLASMA, CURVA DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE CELULAR

Foi demonstrado por meio do qPCR que as células isoladas estavam livres de Mycoplasmas e Ureaplasma (Figura 9D). Mediante a análise da curva de crescimento pôde-se observar as quatro fases do crescimento celular em cultura: Em 24 horas após o plaqueamento, as células estavam na Fase Lag (I) correspondendo a uma fase de adaptação com pouca variação do número de células devido a sua aderência na superfície da placa. A partir de 48h até 72h as células se encontravam na Fase Log (II), a qual foi caracterizada pelo aumento exponencial do número de células, em decorrência do seu crescimento sobre toda a superfície da placa de cultivo. Com 72h foi o melhor tempo de duplicação das células (PDT), após esse período as células encontravam-se na Fase de Platô (III), na qual ocorreu redução da

velocidade de crescimento. Em 96h houve grande redução do número de células que suplantavam a quantidade de células vivas (IV-Fase de Morte celular) (Figura 9E).

Figura 9: Células obtidas de pele de equino “Baixadeiro” cultivadas em meio Dmem Ham's - F12 suplementados com soro fetal bovino

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Em (A): células com 24 horas de cultivo, notar no círculo o explante e região de liberação de células; Em (B): notar células em 60% de confluência; Em (C): notar morfologia fibroblastoide das células com citoplasma alongado e sua aderência; (D): Teste de micoplasma em diferentes meios testados; (E)- Curva de crescimento de fibroblastos em vários tempos testados: 24h, 48h, 72h, 96h.

Para a verificação da viabilidade celular foi realizada a contagem antes e após o descongelamento, com uma média de 82,57% de células viáveis. Este resultado demonstrou que as células permanecem viáveis mesmo após o seu

descongelamento, mantendo suas características morfológicas e sua capacidade de proliferação.

5.3.3 ANÁLISE DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO-MTT

Por meio da análise de metabolismo celular (MTT) foi evidenciado que as células de fibroblastos do cavalo Baixadeiro cultivadas em meio DMEM/F12 apresentaram um crescimento progressivo das 24h até 72 horas. Entretanto, o meio MEM/Alpha também apresentou um crescimento progressivo e contínuo, porém com menor taxa de crescimento inicial se comparado com as células cultivadas em DMEM/F12. Já as células cultivadas em meio DMEM-High Glucose, apresentaram um elevado crescimento nas primeiras 24 horas seguido por uma queda até às 48 horas, com um retorno do crescimento até 72 horas. Dessa forma, pode-se concluir que o meio DMEM/F12 quando avaliado mostrou resultados satisfatórios sendo considerado o melhor meio para cultivar as células em decorrência da sua alta taxa de crescimento (Figura 10A-C).

Figura 10: Ensaio metabólico MTT em meio Dmem Ham's F12, F- Ensaio metabólico MTT em meio Mem/ Alpha, G- Dmem High Glucose

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

5. 3.4 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFENOTIPAGEM DOS FIBROBLASTOS

A imunofenotipagem foi realizada por meio de imunofluorescência e por citometria de fluxo, utilizando marcadores específicos para células mesenquimais, hematopoiéticas, precursoras hematopoiéticas, pluripotentes, de citoesqueleto e de proliferação celular.

Na análise qualitativa por imunofluorescência, verificou-se a expressão para marcadores como CD 90, Vimentina, Oct-4, Tra-1, Oct-4, CD-105, CD 117 e ausência de marcação para CD 34. As marcações observadas nas imagens foram realizadas em DAPI na coloração azul, representando o núcleo celular, e em verde FITC corando o citoplasma das células (Figura 11).

Figura 11: Imunocitoquímica de fibroblastos de cavalo “Baixadeiro” em P4

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

5. 4 DISCUSSÃO

O isolamento de fibroblastos tem sido uma fonte alternativa para a conservação de recursos genéticos de animais ameaçados de extinção (ARAT et al., 2011). Atualmente as células derivadas da pele têm sido utilizadas como fonte de obtenção de fibroblastos em decorrência da facilidade de obtenção (TOVAR et al., 2008).

A morfologia celular é um dos parâmetros qualitativos mais importantes de células provenientes da pele (LIU et al., 2008; MEHRABANI et al., 2014). Neste trabalho as amostras foram avaliadas por microscopia óptica, pela qual foi constatado formato fibroblastoide, o qual ao longo das passagens realizadas (até P4), não sofreram alterações após a criopreservação. Além disso, foi demonstrado que as células apresentaram alta capacidade proliferativa estando de acordo com as descrições de Colleoni et al (2009), os quais descreveram que os fibroblastos podem ser subcultivados rapidamente, enquanto, as células epidermais não aderem em um curto espaço de tempo. Devido a estas diferenças, as células de fibroblastos provenientes da derme apresentam vantagens no cultivo celular quando comparados com as células da epiderme.

A manutenção de uma cultura em constante crescimento celular ao longo de muitos meses é uma prática inadequada, pois uma cultura *in vitro* sem alguns cuidados estão susceptíveis as alterações genéticas e fenotípicas durante sua expansão. Por esse motivo, para a criação de um banco germoplasma com células faz-se necessário seguir alguns critérios tais como: seleção de culturas para criopreservação na fase exponencial do crescimento, minimização da exposição das células ao crioprotetor durante a preparação para evitar a toxicidade, procedimentos que proporcionam uma taxa de resfriamento homogênea e ausência de contaminação (STACEY; MASTERS, 2008). Dentre estes critérios, observou-se nas células do cavalo Baixadeiro que a fase exponencial ocorreu em 72 horas, demonstrando ser esta a fase ideal para a criopreservação. Portanto elas deveriam ser conservadas nesta fase em nitrogênio líquido a -196°C para a criação de um banco germoplasma.

O teste de micoplasma é um pré-requisito fundamental para a criação de um banco de linhagens celulares, uma vez que, estes micro-organismos são difíceis de se remover e podem coexistir com células por longos períodos de tempo, portanto, são mais difíceis de se detectar do que bactérias, oomicetos, micetos ou vírus (YOUNG et al., 2010) (NIKFARJAM; FARZANEH, 2012) (LI et al., 2009). Neste trabalho não foi evidenciado a presença de Micoplasma nas células de fibroblastos, mediante o método de nested PCR, o qual é um teste altamente sensível para monitorar até mesmo um número de cópias de Micoplasmas presente em culturas celulares (GOPALKRISHNA et al., 2007).

Após avaliar a ausência de contaminação na linhagem fibroblastoide, seguiu-se com o teste de metabolismo celular buscando identificar qual o melhor meio de cultivo para o crescimento destas células. Sabe-se que a glicose é a fonte de energia para todas as células, no entanto, altas concentrações podem afetar a proliferação, a diferenciação e apoptose, além disso, podem induzir a senescência celular (STOLZING; COLEMAN; SCUTT, 2006) (BORGHESI et al., 2017). A concentração de glicose utilizada nos três meios testados variou de 5,6 a 25mM, sendo que para os fibroblastos verificou-se que a concentração ideal é de 17,6mM, que está presente no meio DMEM/F12. Isso nos leva a induzir que estes fibroblastos necessitam de valores de glicose intermediários para um bom crescimento.

Segundo Dominici et al., (2006) para uma célula humana ser considerada uma célula tronco mesenquimal, a mesma deve expressar as proteínas CD105, CD90, e CD73 e não apresentar marcação para CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD 19 e HLA -DR. Contudo, para animais domésticos e silvestres nada se tem preconizado até o momento, desta maneira nossos resultados se assemelham em parte ao de Dominici et al (2006) demonstrando marcação para CD-105, CD-90 e ausência de marcação para CD-34.

Outra proteína analisada que mostrou marcação foi a vimentina, esta proteína está relacionada a inúmeros processos celulares como: funções na adesão celular, migração e invasão, sinalização, diferenciação, rearranjos do citoesqueleto e regulação da morfologia e plasticidade celular (VUORILUOTO et al., 2011; DAVE 2014).

Para manter um banco de linhagens celulares de alta qualidade e que seja viável a longo prazo, alguns cuidados são necessários; as células que se soltam do explante devem ser passadas rapidamente e com cuidado; reagentes de alta qualidade sempre devem ser usados; as células devem ser criopreservadas com cuidado e um número mínimo de passagens são recomendadas para preservá-las (WU et al., 2008).

5.5 CONCLUSÃO

Em decorrência da sua alta capacidade de expansão e alta viabilidade celular futuramente pode-se criar um banco de linhagens celulares do cavalo Baixadeiro para a conservação genética, contribuindo assim para a preservação das características de adaptação destes animais.

5.6 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. I., P. Inventário de recursos genéticos animais da Embrapa. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro técnico (INFOTECA-E)**, v., n., p., 2016.
- ARAT, S.; CAPUTCU, A. T.; AKKOC, T.; PABUCCUOGLU, S.; SAGIRKAYA, H.; CIRIT, U.; NAK, Y.; KOBAN, E.; BAGIS, H.; DEMIR, K. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. **Reproduction, fertility and development**, v. 23, n. 8, p. 1012-1023, 2011.
- CHUNG, L. B. O.; CHAVES, R. M.; ROSA, L. C. Caracterização Morfológica, Índices Morfométricos e Avaliação Testicular do Cavalo Baixadeiro. 000. ed. São Luís - MA: Editora Valle Indústria Gráfica e Comércio LTDA, 2019. v. 150. 100p.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary research communications**, v. 33, n. 8, p. 811, 2009.

CHAVES. Soroprevalência de mormo, anemia infecciosa equina e brucelose do cavalo baixadeiro*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. v. 22, n. n.1, p. 39-42, 2015.

DAVE, J M., BAYLESS, K. J. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*. v. 21, n. 4, p. 333–344, 2014.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EGITO, A. A., MARIANTE, A. D. S., & ALBUQUERQUE, M. S. M. . Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de zootecnia**, v. 51, n. 194, p. 39, 2002.

FERREIRA. PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-Trypanosoma spp. E ANTILEISHMANIA spp. EM CAVALOS “BAIXADEIROS”. **REVISTA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA**, v. 3, n., p. 77, 2016.

FRANDSON, R.D. et al. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 454p.

GAZOLLA, A. G. S., O.R.; LIMA, F.C. Pelagens do cavalo da raça baixadeira. v. 46, n. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, p., 2015
GOPALKRISHNA, V.; VERMA, H.; KUMBHAR, N.; TOMAR, R.; PATIL, P. Detection of Mycoplasma species in cell culture by PCR and RFLP based method: effect of BM-cyclin to cure infections. **Indian journal of medical microbiology**, v. 25, n. 4, p. 364, 2007.

GIBSON, J. Options and Strategies for the Conservation of Farm Animal Genetic Resources. Report of an International Workshop, AGROPOLIS, Montpellier, France, 7-10 November 2005: **Bioversity International**, 2006.

HALL SJG, B. D. N. Conserving livestock breed biodiversity. . **Trends in Ecology and Evolution [Internet]**. v. 10, n. 7, p. 267, 2015.

LIU, C.; GUO, Y.; GUAN, W.; MA, Y.; ZHANG, H.-H.; TANG, X. Establishment and biological characteristics of Luxi cattle fibroblast bank. **Tissue and Cell**, v. 40, n. 6, p. 417-424, 2008.

MAKKAR, H. P.; VILJOEN, G. J. **Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries**: Springer, 2005.

MOREIRA, N. H., BARBOSA, E. A., NASCIMENTO, N. V., JULIANO, R. S., ABREU, U. G. P. D., & RAMOS, A. F. Seasonal influence on seminal pattern and freezability of pantaneiro bull semen. **Ciência Animal Brasileira**, 17(1), 60-69, 2016.

MEHRABANI, R. M., MEHDI DIANATPOUR, SHAHROKH ZARE, AMIN TAMADON, SEYED EBRAHIM HOSSEINI. Establishment, Culture, and Characterization of Guinea Pig Fetal Fibroblast Cell. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, n., p., 2014.

Na, R. S., Zhao, Q. J., Su, X. H., Chen, X. W., Guan, W. J., & Ma, Y. H. (2010). Establishment and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. *Cytotechnology*, v.62, n.1, p. 43-52.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 13, n. 4, p. 203, 2012.

SERRA, O.R. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equino baixadeiro, 2004. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, 2004. 84p

STACEY, G. N.; MASTERS, J. R. Cryopreservation and banking of mammalian cell lines. **Nature protocols**, v. 3, n. 12, p. 1981, 2008.

STOLZING, A.; COLEMAN, N.; SCUTT, A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. **Rejuvenation research**, v. 9, n. 1, p. 31-35, 2006

TOVAR, H.; NAVARRETE, F.; RODRÍGUEZ, L.; SKEWES, O.; CASTRO, F. O. Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions

and subsequent isolation of primary culture cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 44, n. 8-9, p. 309-320, 2008.

VUORILUOTO, K.; HAUGEN, H.; KIVILUOTO, S.; MPINDI, J. P.; NEVO, J.; GJERDRUM, C; TIRON C.; LORENS, J. B.; IVASKA, J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*.v. 30, n.12, p.:1436–1448, 2011.

WU, H.; GUAN, W.; LI, H.; MA, Y. Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. **Cell biology international**, v. 32, n. 12, p. 1478-1485, 2008.

YOUNG, L.; SUNG, J.; STACEY, G.; MASTERS, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nature protocols**, v. 5, n. 5, p. 929, 2010.

6 CAPÍTULO III

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA A DECELULARIZAÇÃO DE PELE EQUINA: PERSPECTIVAS PARA O REPARO TECIDUAL

Resumo

Sabe-se que na espécie equina ocorre a formação de tecido exuberante de granulação durante a fase de cicatrização e que o tratamento de lesões cutâneas tem sucesso limitado pela ausência de doadores. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de descelularização de pele de equinos que mantenha a arquitetura da matriz extracelular, visando a construção de um substituto cutâneo. Para isso, fragmentos de pele cavalos (n=3) foram descelularizados com 2% SDC e 0,1% Triton por 10 dias e esterilizados com o uso de UV em PBS e 1% de antibiótico. As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina, Ferro coloidal e Picrosirius red. Além disso, o DNA remanescente foi quantificado e após a descelularização foram adicionados 3×10^5 fibroblastos fetais nos *scaffolds* de 125 mm³. Após a cultura *in vitro*, as amostras foram analisadas com 7 e 14 dias, coradas com DAPI para confirmar a presença celular e posteriormente quantificadas as células aderidas. Foi constatado que os componentes da MEC, como proteoglicanos e fibras colágenas, fibronectina e laminina permaneceram presentes após o uso de detergentes, indicando uma descelularização eficiente e com propriedades funcionais para a recelularização. Assim, esses resultados sugerem que esse *scaffold* pode ser testado clinicamente como um substituto da pele para a cicatrização de feridas cutâneas em cavalos.

Palavras-chave: cavalo, *scaffold*, reparo tecidual

6.1 INTRODUÇÃO

Os equídeos têm vários problemas com a cicatrização de feridas que são decorrentes da formação de tecido de granulação exuberante (EGT), onde a ferida fica presa na fase proliferativa do reparo tecidual. Essa condição ocorre principalmente no membro pélvico do cavalo e é prejudicial ao desempenho tanto nos cavalos de raça quanto em mestiços, exercendo um impacto financeiro significativo no comércio de equinos (THEORET 2008; DESCHENE, 2012).

O impacto de feridas em cavalos não está bem documentado, mas as feridas na pele são geralmente tratadas por praticantes de equinos (THEORET et al., 2016; SOLE et al., 2015). Além disso, um relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) afirma que em cavalos com menos de 20 anos, 16–27% das eutanásias são realizadas em resposta a ferimentos, feridas ou traumas. Portanto, esses problemas podem ser resolvidos pelo desenvolvimento da medicina regenerativa (DEKKORDI et al., 2019).

A engenharia de tecidos está emergindo como uma técnica biomédica para auxiliar e acelerar a regeneração de tecidos defeituosos e danificados, com base nos potenciais de cura natural das células, derivados de uma variedade de pacientes (SINGH & ELISSEFF, 2010). O uso de matriz extracelular (MEC) derivada de tecidos descelularizados é importante para a engenharia de tecidos, porque *scaffolds* biológicos imitam a composição nativa do tecido. Além disso, possuem concentrações e proporções semelhantes de fatores de crescimento, proteínas estruturais da membrana basal e glicosaminoglicanos (GAG), dos quais desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural dos tecidos (ARAI et al, 2000; WOLF et al., 2015; HADY et al., 2017).).

Os colágenos compreendem o principal componente estrutural (maior concentração de proteínas na MEC, com 85% da derme sendo colágeno). Isso forma uma rede de fibras de cadeia longa reticuladas para dar resistência e elasticidade à pele e tecido cicatricial saudável (XUE & JACSON et al., 2015).

A matriz extracelular de *scaffolds* biológicos melhoram o crescimento, a migração, a diferenciação celular e podem influenciar positivamente o reparo e a

remodelação dos tecidos (SWINEHART & BADYLAK, 2016). Além disso, as proteínas da MEC são componentes-chave na formação do nicho das células-tronco para manter a homeostase e para direcionar o comprometimento da linhagem (BRIZZI et al 2012). Portanto, pode ser aplicável como uma alternativa à medicina regenerativa, superando a escassez de órgãos doadores e questões associadas à rejeição do enxerto após o transplante (WOLF et al., 2015).

O enxerto de pele tradicional, embora ainda considerado o padrão ouro para o tratamento de feridas, alcança sucesso limitado com cavalos devido à escassez de pele de doadores (STASHAK e THEORET 2008; AGUIAR et al., 2015). Dessa forma, este estudo teve como objetivo obter uma pele descelularizada com a manutenção da matriz extracelular e com capacidade de adesão celular para a construção *in vitro* de um substituto cutâneo para equinos.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética aprovou os procedimentos experimentais para a Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo

6.2.1 Animais

Amostras de tecido animal foram coletadas da pele de três cavalos saudáveis que foram abatidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo. A pele foi excisada 30 minutos após a eutanásia e armazenada a -80 ° C até que o processo de descelularização fosse realizado.

6.2.2 Descelularização da pele

Fragmentos de pele de equinos foram excisados, lavados em solução salina tamponada de fosfato (PBS) e seccionados em fragmentos de 1,5 cm de largura. As amostras tiveram os pelos removidos com cera quente, lavados três vezes por 5 min com EDTA e incubados com solução de desoxicolato de sódio a 2% (SDC) por 10 dias sob agitação. Posteriormente, foram lavados três vezes com triton a 0,1% por 5 minutos. A esterilização das amostras foi realizada com antibiótico a 1% em PBS e deixada em luz ultravioleta por 10 minutos (Figura 12).

Figura 12: Esquema de coleta e descelularização da pele de cavalo

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

6.2.3 Análise histológica das amostras

Amostras dos grupos controle (não descelularizadas) e descelularizadas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 h, posteriormente desidratadas, diafanizadas e embebidas em parafina. Posteriormente, foram preparadas seções de

5um com o auxílio do micrótomo (RM2265, Leica-Nussloch, GE) com posterior coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) para localizar possíveis núcleos celulares remanescentes no MEC, Ferro Coloidal para avaliar a presença de proteoglicanos e Picrosirius red para analisar presença de colágeno.

6.2.4 Quantificação do DNA genômico

Amostras com 40 mg de tecido controle (não decelularizada) foram usadas para isolar o DNA genômico total com o kit genérico de prep Mini Spin Spin (GE Healthcare) da Illustra™ Tissue & Cells, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram digeridas usando Proteinase K por 16 horas até a digestão completa do tecido. As amostras foram tratadas com RNaseA, foram purificadas e medidas espectrofotometricamente (Nanodrop, Thermo Scientific) a 260/280 nm. Para todas as quantificações, pelo menos três réplicas biológicas foram analisadas

6.2.5 Recelularização com fibroblasto fetal

Os fragmentos de *scaffolds* foram incluídos em placas de 48 poços com meio base contendo DMEM low glicose (1 g / l) com 10% de SFB, 1% de penicilina / estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco), 1% de glutamina (Gibico). Após 48 h neste meio de cultura, adicionou-se uma quantidade de 3×10^5 fibroblastos fetais em cada poço. As amostras foram analisadas com 7 e 14 dias.

Figura 13: Esquema de recelularização com fibroblastos fetais

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

6.2.6 Quantificação de células nos *scaffolds*

Após 7 e 14 dias, os *scaffolds* foram removidos da placa de cultura e lavado com PBS (Gibco, Grand Island, NY). Depois foi adicionado tripsina durante um total de 8 minutos para remover as células. As células foram coradas com azul de Trypan a 0,4% e o número de células viáveis foram contados usando contador automático de células (Invitrogen).

6.2.7 Imunofluorescência

As amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas com PBS + Tween a 0,5% e incubadas com o anticorpo primário. Para caracterizar a matriz extracelular foi utilizado os anticorpos anti-fibronectina (# NBP1- 91258, 1: 100; Novus Biologicals), colágeno I (#600-401-103 S,) e laminina (abcam 11575, 1:100). Após a incubação dos anticorpos, estes foram lavados em PBS + 0,5% de Tween e os anticorpos secundários Alexa Fluor 594 e Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) foi adicionado. Posteriormente, as placas foram incubadas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcação nuclear. As amostras foram analisadas em

microscópio confocal - Olympus Fluoview 1000 (FV1000). A imunocoloração foi visualizada por microscopia de fluorescência (Axio Observer Z1).

6.3 *RESULTADOS*

O aspecto macroscópico (transparência) dos tecidos cutâneos descelularizados foi visualizado em relação aos seus respectivos controles (Figura 14A-B). Posteriormente, realizamos a análise microscópica para coloração de hematoxilina e eosina, com o objetivo de verificar a redução de núcleos celulares nos tecidos, sendo possível verificar a diferença entre os tecidos controle (não descelularizados) que apresentaram células em todo o tecido, em relação às amostras descelularizadas onde não era mais possível verificar núcleos celulares (Figura 14C-D).

A coloração com ferro coloidal revelou que no grupo descelularizado houve marcação de proteoglicanos demonstrando que essa proteína foi preservada após o uso de detergentes (Figura 14E-F).

Figura 14: Análise das amostras após o processo de descelularização

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Caracterização da pele de equinos (controle e descelularizada). Análise macroscópica mostrando transparência do *scaffold* decelularizado [A e B]. Análise microscópica após coloração com hematoxilina e eosina [C e D] mostrando a ausência de núcleos no tecido decelularizado. [E e F] Coloração coloidal de ferro mostrando presença de proteoglicanos (azul) e colágeno (vermelho) no tecido decelularizado.

Para quantificar a área de fibras colágenas, as amostras foram coradas com Picrosirius red (Figura 15A-B) das quais, a área de colágeno foi menor na pele decelularizada (Figura 14C) em comparação com a pele controle (não decelularizada), porém 85% de colágeno foi preservado.

Figura 15: Análise das fibras colágenas dos *scaffolds* controles e descelularizados

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019).

Legenda: [A e B] Análise histológica do colágeno respectivamente das amostras controle e descelularizadas [C]-Quantificação de colágeno (análise histológica) no controle e descelularizado. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$)

Outras proteínas mantidas após o uso do detergente, foram laminina, fibronectina e especificamente o colágeno tipo I (Figura 16).

Figura 16: Imunofluorescência dos *scaffolds* controles e descelularizados

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019).

Legenda: Expressão de proteínas na matriz extracelular de *scaffolds* de pele equina, A e B- Marcação para laminina, C e D-Marcação para fibronectina, E e F -Marcação para colágeno tipo I, amostra controle e descelularizada, respectivamente.

Por fim, para confirmar a eficácia do protocolo de descelularização com SDC a 2% e 0,01% de Triton, foi realizado DNA genômico, do qual foi possível observar diferença significativa entre as amostras não descelularizadas e descelularizadas. Os

scaffolds de pele obtidos por descelularização mostraram $1,01 \pm 1,21$ ng/mg e ausência de marcação para o Dapi (Figura 17).

Figura 17: Quantificação de DNA genômico das amostras descelularizadas e controle

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: A- Quantificação de DNA genômico das amostras controle e descelularizadas, B- Amostra descelularizada com Dapi, mostrando a ausência de núcleos celulares.

Por meio da microscopia confocal, as imagens Z Stack confirmaram que as células se aderiram tanto na superfície quanto penetraram nos *scaffolds* (Figura 18A). Além disso, foi possível verificar que as células cresceram nos *scaffolds* após sete dias (Figura 18B).

Figura 18: Recelularização de scaffolds

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Recelularização de *scaffolds* com fibroblastos fetais. [A] Imagens de microscopia confocal dos núcleos celulares (DAPI) após 7 dias em cultivo, mostrando a presença de fibroblastos no interior do *scaffold*. [B] Contagens de células vivas presentes nos scaffolds de pele tripsinizados aos 7 e 14 dias após a recelularização

6.4. DISCUSSÃO

Scaffolds ricos em colágenos foram obtidos a partir da pele de cavalo. Nosso protocolo mais eficiente com 2% SDC e 0,1% triton proporcionou uma remoção completa das células, baixo índice de DNA remanescente e com a MEC organizada e íntegra após 10 dias sob imersão em detergentes, confirmando que os protocolos que contêm SDC levam a produção de *scaffolds* com qualidade.

Vários tipos de produtos químicos têm sido utilizados no processo de descélularização, incluindo surfactantes ácidos e bases. Os surfactantes, agentes descélularizantes mais comuns, normalmente funcionam por meio da lise celular com o desarranjo da membrana celular fosfolipídica (Nazari et al., 2012). A abordagem frequentemente utilizada é a descélularização à base de detergente, incluindo SDS, Triton X100, desoxicolato de sódio (SDC) e 3- (3-colamidopropil) dimetilamônio) -1-propanossulfonato (CHAPS). Neste trabalho, baseamos nosso processo de descélularização da pele em estudos anteriores usando SDC 2%, que é um surfactante iônico que funciona solubilizando a membrana celular. Em outros estudos,

o SDC produziu suportes altamente biocompatíveis, pois as células semeadas nas matrizes descelularizadas com o SDC exibiram maior atividade metabólica em comparação com as descelularizadas via dodecilsulfato de sódio (SDS) (Syed et al., 2014).

A descelularização de fato permitiu a preservação de colágenos, proteoglicanos em nossos *scaffolds*, o que pode influenciar uma variedade de processos fundamentais, como adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Os PGs são proteínas ou glicoproteínas principais com grandes cadeias laterais de glicosaminoglicanos e participam de interações célula-célula e célula-matriz, proliferação, migração celular e na sinalização de citocinas e fatores de crescimento associados à cicatrização de feridas (Cattaruzza & Perris, 2005, Hattori et al., 2011).

Os colágenos compreendem o principal componente estrutural e a maior concentração de proteínas na MEC, com 85% da derme sendo colágeno. Isso forma uma rede descontraída de fibras de cadeia longa reticuladas para dar força e elasticidade à pele e tecido cicatricial saudáveis, mantém a estrutura e a integridade da pele e pode atuar na modulação da adesão da matriz celular (Wolfram et al., 2009). Os dois tipos dominantes de colágeno no reparo de feridas são o colágeno I e III, com colágeno III compreendendo 20% do total. Durante os estágios iniciais da formação do tecido de granulação, a expressão do colágeno III aumenta mais do que a expressão do colágeno I nos estágios iniciais da cicatrização, resultando em aumento da proporção entre os dois subtipos de colágeno, de 20% a 50% do colágeno III. Dessa forma, o colágeno preservado na pele descelularizada pode desempenhar um fator importante para o processo de cicatrização de feridas (Xue e Jackson., 2015).

Nós observamos a expressão e distribuição dos componentes da MEC nos tecidos controle (não descelularizado) e descelularizado com o objetivo de proporcionar avanços na bioengenharia tecidual para lesões cutâneas em equinos. Confirmamos que as proteínas da pele de cavalo foram preservadas após o processo de descelularização. Durante o processo de recelularização dos *scaffolds* foi encontrado fibroblastos fetais aderidos na matriz extracelular. O uso dessas células na cultura 3D pode ajudar na compreensão dos mecanismos de interação célula-matriz, uma vez que, essas células são relativamente quiescentes e são as principais

responsáveis pela produção e rotatividade de moléculas na matriz extracelular (TRACY et al., 2016).

Além disso, a descelularização da pele equina representou o primeiro passo para a construção de uma pele funcional com todas as suas camadas e com propriedades arquitetônicas que podem ser usadas futuramente para enxertos em cavalos.

6.5 CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a MEC foram mantidas em *scaffolds* de pele eqüinos decelularizados após a remoção completa das células e que a recelularização é alcançada dentro de 7 dias usando fibroblastos fetais. Juntos, esses resultados sugerem que esse *scaffold* pode ser testado clinicamente como um substituto da pele para a cicatrização de feridas cutâneas em cavalos.

6.6 REFERENCIAS

AGUIAR, C., THERRIEN, J., LEMIRE, P., SEGURA, M., SMITH, L. C., & THEORET, C. L. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine veterinary journal*, v.48, n.3, 338-345, 2016

Arai T, Kanje M, Lundborg G, Sondell M, Liu XL, Dahlin LB. Axonal outgrowth in muscle grafts made acellular by chemical extraction. *Rest Neurol Neurosci*. v17, n.2, p. 165-174. 2000;

BRIZZI, Maria Felice; TARONE, Guido; DEFILIPPI, Paola. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*, v. 24, n. 5, p. 645-651, 2012.

DEHKORDI, Azar Nourian et al. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem cell research & therapy*, v. 10, n. 1, p. 111, 2019.

M. Nazari, M. Kurdi, and H. Heerklotz, "Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order," *Biophysical Journal*, vol. 102, no. 3, pp. 498–506, 2012.

N. Hattori, D. A. Carrino, M. E. Lauer et al., "Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 39, pp. 34298–34310, 2011.

O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day, H.-W. Kim, and J. C. Knowles, "Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043–5054, 2014.

S. Cattaruzza and R. Perris, "Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading," *Matrix Biology*, vol. 24, no. 6, pp. 400–417, 2005.

SINGH, Anirudha; ELISSEFF, Jennifer. Biomaterials for stem cell differentiation. *Journal of Materials Chemistry*, v. 20, n. 40, p. 8832-8847, 2010.

Sole A, Bolwell C, Riley C, Theoret C. Descriptive survey of wounds in horses presented to Australian veterinarians. *Austral Equine Vet* 2015; 34: 68–74.

Stashak T. and Theoret, C. (2008) *Equine Wound Management*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

SWINEHART, Ilea T.; BADYLAK, Stephen F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Developmental Dynamics*, v. 245, n. 3, p. 351-360, 2016.

THEORET CL, BOLWELL CF, RILEY C.B. A crosssectional survey on wounds in horses in New Zealand. *N Z Vet J* 2016; 64:90–94. 7.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in wound care*. v. 5, n. 3, p. 119-136, 2016.

WOLF, M. T., DEARTH, C. L., SONNENBERG, S. B., LOBOA, E. G., & BADYLAK, S. F. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced drug delivery reviews*, v. 84, p. 208-221, 2015.

WOLFRAM D, TZANKOV A, PULZL P, AND PIZA-KATZER H: Hypertrophic scars and keloids—a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg*.v. 35, n.171, 2009.

XUE, M., & JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*. v. 4, n.3, p. 119-136, 2015.

XUE, M; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, v. 4, n. 3, p. 119-136, 2015.

7 CAPÍTULO IV

DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EM KERATINÓCITOS SOBRE SCAFFOLDS BIOLÓGICOS

7.1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que, em geral, os cavalos têm vários problemas na cicatrização de feridas como resultado do tecido de granulação exuberante (EGT), onde a ferida fica presa na fase proliferativa de reparo (THEORET 2008; DESCHENE, 2012). No processo de cicatrização de queratinócitos basais, os fibroblastos locais migram através da matriz provisória da ferida, proliferam e sintetizam colágeno III, fibronectina e outros componentes para formar uma nova estrutura mecânica, fechando a lacuna de tecido na ferida (SANTOS et al., 2018).

Estudos têm descrito o uso de autoenxertos de pele para o tratamento de feridas em equinos (THEORET, 2008; CERATO et al., 2014), mas esse tratamento é útil apenas para feridas pequenas e é limitado pela falta de doadores. O desenvolvimento de equivalentes de pele derivados *in vitro* por meio da engenharia de tecidos tem sido dificultado parte por falta de um *scaffold* adequado. O reparo da pele é o resultado da dinâmica e interação de processos que envolvem fatores solúveis, elementos sanguíneos e componentes da matriz extracelular (MEC) (CLARK, 2007). Várias proteínas da MEC desempenham um papel na re-epitelização da ferida, seja por contato direto com queratinócitos ou indiretamente, afetando o tecido de granulação. Além disso, as proteínas da MEC servem como substrato para a migração de células-tronco endógenas (ROUSSELE et al., 2019). Consequentemente, o uso de MEC derivada de tecidos descelularizados é uma via importante para engenharia de tecidos porque a biologia do *scaffold* imita a composição nativa do tecido.

Nesse contexto, emergem as células-tronco, com potencial de auto-renovação e com a capacidade de se diferenciar em linhas celulares distintas. Estudos mostraram que as células-tronco mesenquimais são uma grande promessa para a engenharia de tecidos devido à sua aplicabilidade clínica (GIMBLE et al., 2012; ZAKIROVA et al., 2019; DEHKORDI et al., 2019). curiosamente, existem evidências de que os *scaffolds* de órgãos auxiliaram na diferenciação das CTMs (JIANG et al., 2014). Provavelmente, a capacidade do *scaffolds* de promover a diferenciação das ctm deve-se às comunicações de célula-mec específicas de órgãos (GUILAK, et al., 2019; ZHANG et al., 2009; REILLY E ENGLER, 2010).

Outra abordagem promissora para a engenharia de tecidos é o uso de células pluripotente induzida (iPSC). As iPSC são geradas por meio da reprogramação de células somáticas usando genes pluripotentes específicos que as tornam em estado “embrionário” (Takahashi & Yamanaka, 2006). Devido à possibilidade de reprogramar células somáticas, as iPSC permitem o uso de células derivadas de pacientes para fornecer uma fonte celular para a construção de substituições de tecidos específicos do paciente (SCARRITT et al., 2015).

A vantagem de usar iPSC eqüina (eiPSC) para induzir diferenciação em tipos específicos de células tem sido explorado na busca por melhorias no tratamento de lesões cutâneas por sua diferenciação eficiente na linhagem de queratinócitos (AGUIAR, 2015). Portanto, as propriedades específicas das MSC e iPSC quando associado ao *scaffold* derivado da pele aperfeiçoaria as abordagens atuais de engenharia tecidual, produzindo a pele funcional, incluindo todas as suas camadas, com propriedades mecânicas, arquitetônicas e bioativas que se integrarão aos tecidos hospedeiros sem cicatrizes em feridas agudas e crônicas de cavalos

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética aprovou os procedimentos experimentais para a Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo

7.2.1 ANIMAIS

7.2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EQUINAS

A Linhagem de célula mesenquimal utilizada foi fornecida pelo **Centre de recherche en reproduction et fertilité (Université de Montréal)**.

7.2.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FIBROBLASTOS FETAIS DE EQUINOS

Realizou-se a biopsia de pele da região cervical (cerca de 1 cm²) de feto equino do grupamento racial Baixadeiro de aproximadamente 6 meses de idade gestacional. Procedeu-se com a lavagem em solução tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de penicilina e estreptomicina, maceradas e cultivadas utilizando a técnica de explante primário (FRESHNEY et al., 2000). Estas amostras foram cultivadas em meio DMEM/F12 (BR30004-05; LGC Biotecnologia) suplementados com 15% de soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato de sódio (Sigma, Cat. S8636, St. Louis, Mo. USA), 1% de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01). As placas foram mantidas em incubadora a temperatura de 38,5°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. A outra linhagem celular utilizada foi fornecida pelo **Centre de recherche en reproduction et fertilité (Université de Montréal)**.

7.2.4 TRANSFEÇÃO DOS FIBROBLASTOS FETAIS EQUINOS

Os fibroblastos foram transfectados com o dispositivo de eletroporação Neon (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, usando o programa predefinido 14. Para cada eletroporação em 10 µl de tips, foram utilizados 5x10⁴ células com um total de 1 µg de DNA misto (em proporções iguais de peso de PB-

TET-MKOS, PB-CAG-rtTA, PB-CAG-GFP e pCyL43. As células foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço de uma superfície de 9,6 cm² de acordo com o protocolo de (NAGY et al., 2011) (Figura 19).

Figura 19: Esquema de transfecção de fibroblastos fetais do cavalo Baixadeiro e controle

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

7.2.5 ESTABELECIMENTO DE LINHAS CELULARES EIPS

As colônias foram coletadas mecanicamente e somente a partir da primeira passagem, as linhagens foram propagadas enzimaticamente com o TrypLE Select (Invitrogen # 12563), cultivadas em monocamadas de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) inativadas por mitomicina na concentração de $1,5 \times 10^5$. As células foram criopreservadas em 90% de FBS e 10% de DMSO.

7.2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES EIPS

Foram selecionadas as melhores linhagens celulares baseados nas características morfológicas das colônias, GFP positivas, alcalino fosfatase positivas e expressão de marcadores por qPCR de genes exógenos (KIF 4, Sox 2) e endógenos (Nanog) e diferenciação *in vitro* para corpos embrioides.

7.2.7 FOSFATASE ALCALINA

A coloração da fosfatase alcalina foi realizada em células cultivadas em placas de cultura de tecidos de 6 poços. As células foram lavadas uma vez com DPBS e coradas com o kit de coloração AP (Stemgent Cat# 00-0055) de acordo com as instruções do fabricante.

7.2.8 EXTRAÇÃO DE RNA e qPCR PARA AS LINHAGENS EiPS

Para a extração de RNA utilizou-se eiPS em P3 (Baixadeiro e grupo controle) dos quais, para a formação do pellet, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos. Em seguida, todo o sobrenadante era descartado e o pellet congelado em nitrogênio líquido instantaneamente. O RNA total das amostras foi isolado usando o Kit Arcturus PicoPure (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do material coletado foi obtido pela análise no espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA). Com a finalidade de normalizar as reações de síntese de cDNA esta foi realizada com o RNase-free DNase (cat. #79254).

A reação foi realizada a 42 ° C por 60 min. Para todas as amostras, um RT negativo foi utilizado como controle, consistindo em uma reação de RT omitindo o cDNA. Além disso, como controle negativo das EiPS foram usadas amostras de fibroblastos sem passarem pelo processo de transfecção. Os seguintes primers utilizados encontram-se na tabela 3.

Tabela 1– Sequência dos primers utilizados para caracterização das iPSCs.

Genes	Sequência de Primer		Produto de PCR (pb)
	Forward	Reverse	
GAPDH	GAGATCCCGCCAACATCAAA	AAGTGAGCCCCAGCCTTCTC	97
eSDHA	GCACCTACTTCAGCTGCACG	AACTCCAAGTCCTGGCAGGG	94
RPL 32	GAAGCACATGCTGCCCAGT	CACGATGGCTTTGCGGTTC	139
SOX-2	CTTGGCTCCATGGGTTTCG	TGGTAGTGCTGGGACATGTGA	188
Nanog	CGGGGCTCTATTCTACCACC	GAGCACCAGGTCTGACTGTT	157
Oct-4	GAGAGGCAACCTGGAGAACAT	ACTCGTACCACGTCCTTCTCG	105

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

7.2.8 FORMAÇÃO DE CORPOS EMBRIOIDES

Para a formação de corpos embrióides utilizou-se primeiramente placas de 6 poços contendo as colônias de EiPS confluentes. Estas foram dissociadas com Tryple Express e re-plaqueadas em placas de 6 poços com meio contendo DMEM High Glucose (Invitrogen 11960-044), 2mM Glutamax, 1mM de piruvato, 0,1mM bmercaptoetanol, 50 U/MI penicilina Streptomycin, 15% de soro fetal bovino (cat. # 10099, Gibco) por uma hora para a adesão das MEFs. Em seguida, coletou-se o sobrenadante contendo as EiPS e plaqueou-se em placas Ultra Low attachment (Corning®).

Com 24 horas, foi observado a formação de pequenos corpos embrióides, estes foram cultivados por mais 6 dias para expansão com troca de meio a cada dois dias.

7.2.9 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EM KERATINÓCITOS NO MODEL 2d E 3d

Para a diferenciação de células mesenquimais em queratinócitos, primeiramente foram preparados os *scaffolds* (*scaffolds* do Cavalo Baixadeiro e do Puro sangue Inglês) em placa de 48 poços em meio contendo DMEM Low glucose (Gibco), 1mM de piruvato, 50 U/ML penicilina Streptomycin, 15% de soro fetal bovino (cat. # 10099, Gibco) por 48h. Após esse período foi adicionado 6×10^5 células MSCs e durante o período de sete dias foram mantidas nestas condições para que ocorresse a adesão e proliferação celular. Após esse período foi adicionado 10 ng/ml de fator de crescimento de queratinócitos (KGF), 30 ng/ml fator de crescimento epidermal (EGF). Após três dias foram adicionados 60 ng/ml de fator de crescimento de insulina (IGF-2) e 10 ng/ml de fator de crescimento de hepatócitos (HGF). As amostras foram analisadas em D9, D16 e D21 conforme o esquema abaixo (Figura 20).

Figura 20: Esquema do protocolo de diferenciação de células mesenquimais em queratinócitos sobre *scaffolds* do cavalo Baixadeiro e Puro Sangue Inglês

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Para a diferenciação de EiPS em queratinócitos foram utilizados os corpos embrióides. Estes foram dissociados com tripsina (Gibco) e colocados nos *scaffolds* na concentração de 1×10^5 e mantidos durante três dias em meio de corpos embrióides para a adesão e proliferação celular. Após três dias foram tratados com $1 \mu\text{mol/l}$ de ácido retinóico (RA) por três dias e em seguida 25ng/ml de proteína morfogenética óssea (BMP4) por três dias, conforme descrito por Aguiar et al, (2016). Em seguida foi adicionado o meio de diferenciação de queratinócitos que consistiu de DMEM/F12, 2% FBS, $25\mu\text{g/ml}$ gentamicina, 100X penicillin-streptomycina, 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal, $5 \mu\text{g/ml}$ insulina e $30 \mu\text{g/ml}$ extrato pituitário bovino. As amostras foram mantidas em meio de diferenciação durante sete dias. Para o cultivo 2D, as placas de cultivo foram revestidas com colágeno. Durante a diferenciação o meio foi trocado a cada dois dias e incubados em 5% de CO_2 a $38,5^\circ \text{C}$ (Figura 21).

Figura 21: Esquema usado para a diferenciação de eiPSC em keratinócitos

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: A pele foi coletada e decelularizada em um curto período de tempo de processamento usando 2% SDC para fornecer *scaffolds* naturais. Investigar a eficiência da diferenciação de eiPSCs em queratinócitos em condições 2D e 3D, iPSCs equinas foram geradas a partir de fibroblastos fetais e

cultivados em placas low attachment por seis dias como corpos embrioides. Posteriormente, Ebs foram dissociados e cultivados em placas de cultivo celular (2D) e em scaffolds (3D).

7.3 RESULTADOS

Após 13 dias da transfecção, observou-se a formação das primeiras colônias, sendo estas, compactas de bordas claras e bem definidas (Figura 22).

Figura 22: Análise morfológica das colônias eiPSC

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Morfologia das colônias eiPSC primárias do cavalo Baixadeiro (A, B, C) e do grupo controle (D, E, F), B e C-Expressão de GFP em colônias de EiPS do cavalo Baixadeiro. E e F- Expressão de GFP em colônias de EiPS do grupo controle.

Quando comparado a quantidade de colônias formadas do cavalo Baixadeiro com o grupo controle, observou-se que houve maior formação de colônias no grupo

controle (24 colônias do grupo controle e 10 colônias do cavalo Baixadeiro). Foram separadas 12 colônias (6 Baixadeiros e 6 controles) que deram origem a 12 linhagens celulares distintas. Com o intuito de selecionar as melhores linhagens celulares EiPS, primeiramente realizou-se a triagem com base na expressão de GFP (Tabela 04).

Tabela 04: Expressão de GFP das linhagens eIPSC

Linhagens eIPSC	GFP
Controle 1	—
Controle 2	+
Controle 3	+
Controle 4	+
Controle 5	+
Controle 6	—
Baixadeiro 1	+
Baixadeiro 2	—
Baixadeiro 3	+
Baixadeiro 4	—
Baixadeiro 5	+
Baixadeiro 6	+

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Na sequência foram separadas as colônias que tiveram maior expressão de OCT-4 e Nanog (Figura 23).

Figura 23: Análise da expressão gênica das linhagens eIPSC

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Essa seleção prévia fez com que escolhêssemos três linhagens celulares de cada grupo. Com a associação do teste de fosfatase alcalina (FA) e formação de corpos embrióides pode-se escolher uma linhagem eiPS de cada grupo (Figura 24).

Figura 24: Análise das linhagens eiPS do cavalo Baixadeiro e controle

Fonte: (ANUNCIAÇÃO, 2019)

Legenda: Morfologia das colônias eIPSC em P3 do grupo controle (A) e do cavalo Baixadeiro (B), C e D-Corpos embrioides no sexto dia, grupo controle e Baixadeiro, respectivamente. E e F- Teste de fosfatase alcalina, do qual pode-se observar colônias positivas, do grupo controle e cavalo Baixadeiro, respectivamente.

5.6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C., THERRIEN, J., LEMIRE, P., SEGURA, M., SMITH, L. C., THEORET, C. L. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 3, p. 338-345, 2016.

THEORET, C. Tissue engineering in wound repair: the three “R” s—repair, replace, regenerate. **Veterinary Surgery**, v. 38, n. 8, p. 905-913, 2009.

CERRATO, S., RAMIÓ-LLUCH, L., BRAZÍS, P., RABANAL, R. M., FONDEVILA, D., PUIGDEMONT, A. Development and characterization of an equine skin-equivalent model. **Veterinary dermatology**, v. 25, n. 5, p. 475-e77, 2014.

CLARK, R. A., GHOSH, K., & TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018-1029, 2007.

ROUSSELLE, P., MONTMASSON, M., GARNIER, C. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

SCARRITT, M. E., PASHOS, N. C., BUNNELL, B. A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 43, 2015.

ZAKIROVA, E. Y., SHALIMOV, D. V., GARANINA, E. E., ZHURAVLEVA, M. N., RUTLAND, C. S., RIZVANOV, A. A. Use of biologically active 3D matrix for extensive

skin defect treatment in veterinary practice: Case report. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 76, 2019.

GUILAK, F., COHEN, D. M., ESTES, B. T., GIMBLE, J. M., LIEDTKE, W., & CHEN, C. S. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. **Cell stem cell**, v. 5, n. 1, p. 17-26, 2009.

Y. ZHANG et al., Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. **Biomaterials**, v. 30, n. 23-24, p. 4021-4028, 2009.

REILLY, G. C., ENGLER, A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 55-62, 2010.

JIANG, W. C., CHENG, Y. H., YEN, M. H., CHANG, Y., YANG, V. W., & LEE, O. K. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. **Biomaterials**, v.35, n.11, p. 3607-3617.

NAGY, K., SUNG, H. K., ZHANG, P., LAFLAMME, S., VINCENT, P., AGHA-MOHAMMADI, S., NAGY, A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.3, p. 693-702, 2011.

CONCLUSÃO GERAL

Aos 40 dias gestacionais ocorre a estratificação da epiderme e derme de embriões equinos e a partir do isolamento de fibroblastos provenientes da derme do cavalo Baixadeiro pode-se criar um banco de germoplasma para a conservação genética. Além disso, foi possível produzir *scaffolds* ricos em proteínas de matriz extracelular que associados às células tronco podem aperfeiçoar as abordagens atuais de engenharia tecidual para a produção de uma pele funcional, com propriedades mecânicas, arquitetônicas e bioativas para o tratamento de feridas cutâneas em cavalos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.; THERRIEN, J.; LEMIRE, P.; SEGURA, M.; SMITH, L. C.; THEORET, C. L. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. **Equine veterinary journal**, v.48, n3, p.338-345, 2016.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

BAJADA, S.; MAZAKOVA I.; RICHARDSON J. B.; ASHAMMAKHI N. Updates on stem cells and their application in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. v. 2, n.4, p.169–83, 2008.

BAO, L.; HE, L.; CHEN, J.; WU, Z.; LIAO, J.; RAO, L.; REN, J.; LI, H.; ZHU, H.; QIAN, L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. **Cell research**, v. 21, n. 4, p. 600-608, 2011.

BAVIN, E. P.; SMITH, O.; BAIRD, A. E.; SMITH, L. C.; GUEST, D. J. Equine induced pluripotent stem cells have a reduced tendon differentiation capacity compared to embryonic stem cells. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, n.55, 2015.

BAZZI, H.; FANTAUZZO, K. A.; RICHARDSON, G. D.; JAHODA, C. A.; CHRISTIANO, A. M. Transcriptional profiling of developing mouse epidermis reveals novel patterns of coordinated gene expression. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 961-970, 2007

BEYER, T. A.; WERNER, S.; DICKSON, C.; GROSE, R. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. **Experimental Cell Research**, v. 287, p. 228–236, 2003.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313–319,

BILOUSOVA, G.; CHEN, J.; ROOP, D.R. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 4, p. 857-864, 2011.

BITTENCOURT, A. C. D. S.; DOMINGUEZ, J.M.L.; MOITA FILHO, O. Variações texturais induzidas pelo vento nos sedimentos da face da Praia de Atalaia, Piauí. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, n.1-4, 201-207, 1990.

BLANPAIN C.; FUCHS E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 207-217, 2009.

BRAGULLA, H. Fetal development of the segment-specific papillary body in the equine hoof. **Journal of morphology**, v. 258, n. 2, p. 207-224, 2003.

BRIZZI, M.F.; TARONE, G.; DEFILIPPI, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, p. 645, 2012.

BROCKES, J. P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Rev. Mol. Cell Biol**, v. 3, p. 566–574, 2002.

BYRNE, C.; TAINSKY, M.; FUCHS, E. Programming gene expression in developing epidermis. **Development**, v. 120, n. 9, p. 2369-83, 1994.

CAO, N.; LIU, Z.; CHEN, Z.; WANG, J.; CHEN, T.; ZHAO, X.; MA, Y.; QIN, L.; KANG, J.; WEI, B. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. **Cell research**, v. 22, n. 1, p. 219-236, 2012.

CARDELLINO, R. A. Status of the world's livestock genetic resources. Preparation of the first report on the state of the world's animal genetic resources. In: **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/biotech/docs/cardellino.pdf>. Acesso em: 20 de agosto, 2019.

CHAVES, D. P.; BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; VAZ, J. F. R.; ANUNCIAÇÃO, A. R. Soroprevalência de mormo, anemia infecciosa equina e brucelose do cavalo baixadeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.22, n.1, 2015.

CHAVEZ-MUNOZ, C.; NGUYEN, K. T.; XU, W.; HONG, S. J.; MUSTOE, T. A.; & GALIANO, R. D. Trans-differentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. **PloS One**, v. 8, n. 12, 2013. **e80587**.

CHO, Y; RYOO, H. Trans-differentiation via Epigenetics: A New Paradigm in the Bone Regeneration. **Journal of bone metabolism**, v. 25, n. 1, p. 9-13, 2018.

CIEŚLAR-POBUDA, A, KNOFLACH, V.; RINGH, M.V.; STARK, J.; LIKUS, W.; SIEMIANOWICZ, K.; GHAVAMI, S.; HUDECKI, A.; GREEN, J.L.; ŁOS, M.J. Transdifferentiation and reprogramming: overview of the processes, their similarities and differences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 7, p. 1359-1369, 2017.

COSTA-NETO, J. P.; BARBIERI, R.; IBÁÑEZ, M. S. R.; CAVALCANTE, P. R. S.; PIORSKI, N. M. Limnologia de três ecossistemas aquáticos característicos da baixada maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, p.14-19, 2001.

COWAN CA, ATIENZA J, MELTON DA, EGGAN K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1369–1373, 2005.

DAWSON, E.; MAPILI, G.; ERICKSON, K.; TAQVI, S.; ROY, K. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 2, p. 215-228, 2008.

DE LIMA, L. R.; MENDES, H. M. F.; MAGALHÃES, J. F.; MARKOWICZ, L. C.; CAVALCANTI, C. B.; LEME, F. O. P.; TEIXEIRA, M. M.; FALEIROS, R. R. Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofructose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p.992-998, 2013.

DENNING, M. F.; DLUGOSZ, A. A.; HOWETT, M. K.; YUSPA, S. H. Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C delta. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26079-26081, 1993.

DIAS, D. P. M.; TEIXEIRA, L. G.; BERNARDI, N. S.; GRAVENA, K.; ALBERNAZ, R. M.; VALADÃO, C. A. A.; DE QUEIROZ NETO, A.; DE LACERDA NETO, J. C. Técnica para avaliação da pressão arterial pulmonar de equinos durante o

exercício progressivo em esteira rolante. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 254–260, 2013.

DIAS, L. J. B. DA S; BRAGA, K R R; MENDONÇA, J. K. S; COSTA, SIDILENE P; DIAS, J. S. B. DA S. D. Geologia, geomorfologia e unidades de paisagem da baixada maranhense: uma revisão de conceitos aplicadas ao planejamento territorial. **Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada – SGBFASÃO PAULO**. Anais. v. 02. São Paulo: USP/Instituto De Geografia, 2005.

DISCHER, D. E.; JANMEY, P.; WANG, Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1139-1143, 2005.

DO JT, SCHOLER HR. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. **Ernst Schering Research Foundation Workshop**, v. 60, p. 35–45, 2006.

DROSSOPOULOU, G.; LEWIS, K. E.; SANZ-EZQUERRO, J. J.; NIKBAKHT, N.; MCMAHON, A. P.; HOFMANN, C.; TICKLE, C. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long-and short-range Shh signalling and Bmp signalling. **Development**, v. 127, n. 7, p. 1337-1348, 2000.

ENGLER, A. J.; SEN, S.; SWEENEY, H. L.; & DISCHER, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677-689, 2006.

EVANS, N. D.; MINELLI, C.; GENTLEMAN, E.; LAPOINTE, V.; PATANKAR, S. N.; KALLIVRETAKI, M.; ... & STEVENS, M. M. Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. **European cells & materials**, v. 18, n. 1, e13. 2009.

FATIMA, Q.; CHOUDHRY, N.; CHOUDHERY, M. S. Umbilical Cord Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Can Differentiate into Skin Cells. **Open Life Sciences**, v. 13, n.1, p. 544-552, 2018.

FENG, J.; ZHOU, Y.; CAMPBELL, S.L.; LE, T.; LI, E.; SWEATT, J.D.; SILVA, A.J.; FAN, G. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 423–30, 2010.

FINCH, P. W.; RUBIN, J. S.; MIKI, T.; RON, D.; AARONSON, S. A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. **Science**, v. 245, n. 4919, p. 752-755 1989.

FULKA, J. JR.; FIRST, N.L.; LOI, P.; MOOR, R.M. Cloning by somatic cell nuclear transfer. **Bioessays**, v. 20, n. 10, p. 847–851, 1998.

FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 279–283, 2004.

GALLI, C.; DUCHY, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GAZOLLA, A. G. S.; O.R.; LIMA, F.C. Pelagens do cavalo da raça baixadeira. **In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, Maringá: RASBZ, Anais, v. 46, 2009.

GODWIN, A. R.; CAPECCHI, M. R. Hoxc13 mutant mice lack external hair. **Genes & development**, v. 12, n. 1, p. 11-20, 1998.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1061-1067, 2006.

HOCHEDLINGER K, JAENISCH R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. **The New England Journal of Medicine**, v.349, n.3, p.275–286, 2003.

JOPLING, C.; BOUE, S.; BELMONTE, J. C. I. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 79, 2011

PETERS, K.G.; WERNER, S.; CHEN, G.; WILLIAMS, L.T. **Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis.** **Development**, v. 114 p. 233-243, 1992.

KAHATA, K. DADRAS, M. S.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Family Signaling in Epithelial Differentiation and Epithelial–Mesenchymal Transition. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 1, p. a022194, 2018.

KALININ, A.E.; KAJAVA, A.V.; STEINERT, P.M. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. **Bioessays**, v. 24, 2002.

KASTURI, L.; SIZEMORE, N.; ECKERT, R.L.; MARTIN, K.; RORKE, E.A. Calcium modulates cornified envelope formation, involucrin content, and transglutaminase activity in cultured human ectocervical epithelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 205, p. 84–90, 1993.

KHAVARI, D.A.; SEN, G.L.; RINN, J.L. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. **Cell Cycle**. v.9, p. 3880–3, 2010.

KOCH, P.J.; DE VIRAGH, P.A.; SCHARER, E.; Lessons from loricrin-deficient mice: Compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. **Journal of Cell Biology**, v. 151, p. 389–400, 2000.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KOLLY, C.; SUTER, M.M.; MÜLLER, E.J. Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. **Journal of investigative dermatology**, v. 124, n. 5, p. 1014-1025, 2005.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Mechanisms regulating epithelial stratification. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23 p. 93-113, 2007.

LAFONTAINE, L. C. Bublinocultura e impactos socioambientais na área de proteção ambiental da Baixada Maranhense: um olhar sobre o município de Pinheiro. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, UFPA, 2012.

LAFONTAINE, L. C.; LAFONTAINE, T. C.; Campos Inundáveis Do Rio Pericumã No Entorno Da Cidade De Pinheiro: uma beleza ameaçada pela dinâmica das comunidades rurais. In: **IV Jornada Internacional de Políticas públicas**, 2009.

LEE, D. E.; AYOUB, N.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 37, 2016.

LEE, J.; BÖSCKE, R.; TANG, P. C.; HARTMAN, B. H.; HELLER, S.; KOEHLER, K. R. Hair Follicle Development in Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Skin Organoids. **Cell reports**, v. 22, n.1, 242-254, 2018.

LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the Art." **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 2008.

LIANG, L.; BIECKENBACH, J. R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. **Stem Cells**, v. 20, p. 21–31, 2002.

LU, L.L.; LIU, Y.J.; YANG, S.G.; ZHAO, Q.J.; WANG, X.; GONG, W.; HAN, Z.B.; XU, Z.S.; LU, Y.X.; LIU, D.; CHEN, Z.Z.; HAN, Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica**, v. 91, n. 8, p. 1017-26, 2006.

MAHERALI N, HOCHEDLINGER K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p.595–605, 2008.

MARCOS-GARCÉS, V. MOLINA, P.A, SERRANO, C.B.; BUSTOS, V.G, SEGUÍ J.B.; IZQUIERDO, A.F, RUIZ-SAURÍ A. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing—a morphometric and comparative study. **Journal of anatomy**, v. 225, n. 1, p. 98-108, 2014.

MASSAGUE, J. TGF beta signalling in context. **Nature Reviews in Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 616–630, 2012.

M'BONEKO, V.; MERKER, H.J. Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9-12 of gestation). **Acta anatomica**. v.133, n. 4, p. 325-36, 1988.

MOLOFSKY, A.V.; PARDAL, R.; MORRISON, S.J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, n.6, p. 700–7, 2004.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247–57, 1999.

OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; HYENJONG, H.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 949–953, 2008.

PĂUNESCU, V.; DEAK, E.; HERMAN, D.; SISK, I.R.; TĂNASIE, G.; BUNU, C.; ANGHEL, S.; TATU, C.A.; OPREA, T.I.; HENSCHLER, R.; RÜSTER, B.; BISTRAN, R.; SEIFRIED, E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 11, n.3, p. 502–508, 2007.

PEPLOW, Philip V.; CHATTERJEE, Marissa P. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 1–21, 2013.

PEREIRA, G.; SILVA, M. E. S.; MORAES, E. C.; CARDOZO, F. S. Avaliação dos Dados de Precipitação Estimados pelo Satélite TRMM para o Brasil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 18, n. 3, p. 139 - 148, 2013.

PEREIRA, P.R.M.; RODRIGUES, T.C.S. Diagnóstico ambiental e caracterização morfométrica das Microbacias Hidrográficas de Pedro do Rosário, Amazônia Maranhense (Brasil). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, n. 5, p. 153–163, 2016.

RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M.; MARIANTE, A. da S. Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2011.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; MORETTO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n. 7, p. 901, 2008.

REILLY, G.C.; ENGLER, A.J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 55-62, 2010.

REN, J.; PAK, Y.; HE, L.; QIAN, L.; GU, Y.; LI, H.; RAO, L.; LIAO, J.; CUI, C.; XU, X. Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. **Cell research**, v. 21, n. 5, p. 849, 2011.

RENARD, J. P. Chromatin remodelling and nuclear reprogramming at the onset of embryonic development in mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n.7-8, p. 573–580, 1998.

RINN, J. L.; WANG, K.; ALLEN, N.; BRUGMANN, S.A.; MIKELS, A. J.; LIU, H.; RIDKY, T. W.; STADLER, H.S.; NUSSE, R.; HELMS, J. A.; CHANG, H.Y. A dermal hox transcriptional program regulates site-specific epidermal fate. **Genes and development**, v. 22, n. 3, p. 303-7, 2008.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 12, p. 1595-1611, 2003.

TAGASHIRA, S.; HARADA, H.; KATSUMATA, T.; ITOH, N.; NAKATSUKA, M. Cloning of mouse FGF10 and up-regulation of its gene expression during wound healing. **Gene**, v. 197, p. 399-404, 1997.

SANTOS, S.A.; McMANUS, C.; MARIANTE, A.S.; SERENO, J.R.B.; SILVA, J.A.; EGITO, A.; ABREU, U.G.P.; FILHO, J.A.C.; LARA, M.A. Estratégias de conservação *in situ* do Cavalo Pantaneiro. **Documentos Embrapa**, v55, 2003.

SANTOS, A. C. G.; CHAVES, D. P.; LIMA, F. C.; BRITO, D. R. B.; AMORIM FILHO, E. F.; SILCA, C. R.; VAZ, J. F. R.; SILVA, R. L. V.; COSTA, F. B.C.; COSTA, A.P.; LIMA, I. L.; SOARES, E. D. S. Sanidade do grupamento racial “Cavalo Baixadeiro”: doenças parasitárias e infecciosas. In: ALMEIDA, Z. S. da. **Sumário executivo para plano de ação na área de proteção ambiental da Baixada Maranhense**. São Luís: [s.n], p. 218, 2013.

SCOTT DW, MILLER WH. Environmental skin diseases. In: Scott DW, Miller WH, SECCO, M.; MOREIRA, Y. B.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; JAZEDJE, T.; MUOTRI, A. R.; OKAMOTO, O. K.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; ZATZ, M. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units:

Cord is different from blood. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 387–401, 2009.

SEEGER, M. A.; PALLER, A. S. The roles of growth factors in keratinocyte migration. **Advances in wound care**, v. 4, n. 4, p. 213-224, 2015.

SEGRE, J.A. Epidermal differentiation complex yields a secret: mutations in the cornification protein filaggrin underlie ichthyosis vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology** v. 126, 2006.

SELLHEYER, K.; BICKENBACH, J. R.; ROTHNAGEL, J. A.; BUNDMAN, D.; LONGLEY, M. A.; KRIEG, T.; ROCHE, N.S.; ROBERTS, A.B.; ROOP, D. R. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n.11, p. 5237-5241. 2003.

SEN, G.L.; WEBSTER, D.E.; BARRAGAN, D.I.; CHANG, H.Y.; KHAVARI, P.A. Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. **Genes & Development**, v. 22, p.1865–70, 2008.

SEN, G. L.; REUTER, J. A.; WEBSTER, D. E.; ZHU, L.; KHAVARI, P. A. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. **Nature**, v. 463, n. 7280, p.563, 2010.

SERRA, O. R.; LIMA, F. C.; GAZOLLA, A.G. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equino “Baixadeiro”.In: **Anais II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**. Santos, São Paulo, 2004.

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 1, p. 2-2, 2010.

SI, Y.L.; ZHAO, Y.L.; HAO, H.J.; FU, X.B.; HAN, W.D. MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing research reviews**, v, 10, n.1, p. 93 103, 2011.

SILVA, A. R.; SOUZA, A. L. P.; SANTOS, E. A. A. D.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SOUZA, P. C.; CASTELO, T. S. Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 219-234, 2012.

SINGH, A.; ELISSEEFF, J. Biomaterials for stem cell differentiation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, p. 8832–8847, 2010.

STADTFELD, M.; NAGAYA, M.; UTIKAL, J.; WEIR, G.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. **Science**, v. 322, n.5903, p. 945–949, 2008.

SUN, T.; JACKSON, S.; HAYCOCK, J. W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of biotechnology**, v. 122, n. 3, p. 372-381, 2006.

TAGASHIRA, S.; HARADA, H.; KATSUMATA, T.; ITOH, N.; NAKATSUKA, M. Cloning of mouse FGF10 and up-regulation of its gene expression during wound healing. **Gene**, v.197, p. 399–404, 1997.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

THESLEFF, I.; VAAHTOKARI, A.; PARTANEN, A. M. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. **International journal of developmental biology**, v. 39, p.35-50, 1995.

THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. **Development**, v. 126, n. 16, p. 3693-3701, 1999.

TOMMASI JUNIOR, H. L.; FAVARON, P. O.; RODRIGUES, R. F.; GUIMARÃES, J. P.; MIGLINO, M. A. Development of the integumentary system in bovine with estimated gestational ages from 20 to 140 days. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.7, 695-702, 2014.

TSUBOI, R.; SATO, C.; KURITA, Y.; RON, D.; RUBIN, J. S.; OGAWA, H. Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, v. 101, n.1, p.49-53, 1993.

VELTRI, A.; LANG, C.; LIEN, W. Concise review: Wnt signaling pathways in skin development and epidermal stem cells. **Stem Cells**, v. 36, n. 1, p. 22-35, 2018.

WADE, P.A.; KIKYO, N. Choramatin remodeling in nuclear cloning. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n.9, p. 2284-2287, 2002.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810–813, 1997.

WILSON S. I; RYDSTRÖM A; TRIMBORN T; WILLERT K; NUSSE R; JESSELL TM; EDLUND T. The status of wnt sig-nalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. **Nature**, v. 411, n.6835, p. 325-30, 2001.

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n.3, p. 295–302, 2007.

ZHANG, J.; LIU, L.; GAO, Z.; LI, L.; FENG, X.; WU, W.; MA, Q.; CHENG, X.; CHEN, F.; MAO, T. Novel approach to engineer implantable nasal alar cartilage employing marrow precursor cell sheet and biodegradable scaffold. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 67, n. 2, p. 257-64, 2009.

ZHOU, L.; WANG, W.; LIU, Y.; DE CASTRO, J. F.; EZASHI, T.; TELUGU, B. P. V.; ROBERTS, R. M.; KAPLAN, H. J.; DEAN, D. C. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. **Stem cells**, v. 29, n. 6, p. 972-980, 2011.

ZHOU, Y-Y.; ZENG, F. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 284-287, 2013.