HORÁCIO LUIS PINTO TOMMASI JUNIOR

**Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de
fetos caninos**

São Paulo

2015

HORÁCIO LUIS PINTO TOMMASI JUNIOR

Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos

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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Area de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2015

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.3100
FMVZ

Tommasi Jr., Horácio Luis Pinto
Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos / Horácio
Luis Pinto Tommasi Jr. -- 2015.
60 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Célula-tronco. 2. Folículo piloso. 3. Fetos. 4. Cães. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização das células do folículo piloso de fetos caninos", protocolado sob o nº 3041/2013, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Obtention and characterization of stem cells of the hair follicle of canine fetuses", protocol number 3041/2013, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TOMMASI JR, Horácio Luis Pinto

Título: Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos

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 obtenção do título 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 _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus familiares que estiveram comigo ao longo desta jornada,
especialmente aos meus pais **Horácio e Erika**.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Maria Angelica Miglino**, pela disposição em me orientar e compartilhar seu conhecimento ao longo destes anos.

Ao **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria** por ter me recebido de portas abertas e sempre me ajudando a desenvolver e a concluir este trabalho.

A **Profa. Dra. Consuelo Junqueira**, pelo seu auxílio durante os experimentos de imunohistoquímica.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Giorgi**, pela ajuda nas análises de PCR.

A **Dra. Sônia Will** pela contribuição e auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho

A **Dra. Rosângela Rodrigues**, por toda dedicação e empenho e paciência em ajudar neste trabalho.

Ao **Dr. Erik** da campanha de cadastração pelo fornecimento dos animais.

Aos funcionários e técnicos **Jaqueline Santana, Ronaldo Agostinho e Dr. Rose Eli**, por sempre ajudarem quando preciso.

Há todos os colegas do Butantã pela recepção e apoio ao longo desses anos, especialmente **Arthur, Leandro e Thais** pela disposição, paciência em me auxiliar nos laboratórios.

Ao colegas da anatomia da sala 12 **Rafael Carvalho, Marcio Nogueira, Valdir Pavanello, Fernanda Menezes, Dayane Alcântara, Paula Fratini, Phelipe Oliveira Favaron, Bruna Andrade, Dailiany Orechio, Adriana Raquel, Ana Carolina Martins, Luciano Cesar, Cesar Prado Marcio Pereira e Carla Carvalho** e especialmente a **Renan Lopes Olio, Lara Carolina Mario e Jéssica Borghes** por sempre estarem dispostos a ajudar.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King).

RESUMO

TOMMASI JR, H. L. P. **Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos.** [Obtainment and characterization of stem cells from the hair follicle of canine fetuses]. 2015. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O pelo é uma característica dos mamíferos: na maioria das espécies, juntamente com a pele, a pelagem reveste externamente o corpo, com exceção de algumas regiões bem delimitadas. O pelo do cão e demais mamíferos apresenta formato distinto de acordo com a região do corpo. O estudo da obtenção e caracterização de células-tronco em cães poderá ampliar as possibilidades terapêuticas, mediante a utilização das células indiferenciadas na reparação capilar e lesões da pele e seus anexos. Neste trabalho foram utilizadas amostras de folículo piloso retiradas da região rostral de fetos caninos correspondentes a três fases gestacionais distintas (grupo I= 30 dias de gestação; grupo II= 35 dias de gestação; grupo III= 40 dias de gestação). Estas amostras foram cultivadas em placas de Petri de 75 cm² com 5mL de meio de cultivo DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos estreptomicina/penicilina. As células obtidas foram congeladas e descongeladas e utilizados nos procedimentos de, análise da expressão dos marcadores de células-tronco: STRO-1, CD 117, OCT 3/4, CD 90, Nanog, CD- 34, SSEA-4, CD -105, MCP-1, HSP- 47, CD 1 A, VEGFR1, DR4, IL- 1 β , caspase3, Ki- 67, CD -45. A escolha dos anticorpos marcadores de células-tronco foi baseada em estudos que mostraram afinidade e avidéz com o folículo piloso. Utilizamos também para a caracterização do folículo piloso, a imunohistoquímica e análise de PCR com o marcador S100 e a imunocitoquímica com os marcadores OCT 3/4, VEGF, STRO-1, CD117 e Nanog. Os resultados obtidos sugerem que a linhagem celular do folículo piloso de fetos de cães apresentaram crescimento satisfatório com a utilização do meio DMEM-high suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibióticos, sendo mantidas e expandidas em cultivo. O crescimento e a expansão das células-tronco do folículo piloso são peculiares, pois, sua expansão ocorre em torno da haste pilosa, utilizando-a como ancoragem. Os resultados indicaram

características de pluripotência nas células-tronco do folículo piloso pela expressão dos marcadores OCT3/4, Nanog, CD105, CD90, SSEA-4, e STRO-1, em todos os grupos analisados. Considerando, a taxa de proliferação, a fase do ciclo celular, distribuição e aspectos de morte celular não foram encontradas diferenças significantes na expressão dos marcadores HSP47, DR4. Para verificar a angiogênese foram utilizados os marcadores VEGFR1, Ki-67 e caspase-3, sendo expressos em todos os grupos. Na imunohistoquímica e análise de PCR observou-se a expressão da proteína S100, sendo maior nas células do grupo de fetos com 40 dias de gestação- grupo III. Neste estudo, podemos concluir que o conjunto de marcadores expressos nos diferentes grupos de células tronco obtidas das vibrissas de fetos caninos indicaram a expressão de marcadores de pluripotência das células-tronco do folículo piloso.

Palavras- chave: Célula-tronco. Folículo piloso. Fetos. Cães.

ABSTRACT

TOMMASI JR, H. L. P. **Obtainment and characterization of stem cells from the hair follicle of canine fetuses.** [Obtenção e caracterização das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos]. 2015. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Hair is a characteristic of mammals, since in most species the coat spreads throughout the body, except for some well-defined regions. Mammals in general, including dogs, have different characteristics in their coat according to the region of the body. The study of obtainment and characterization of stem cells from the hair follicle could contribute to new therapeutic possibilities, particularly in the treatment of hair, skin and its appendages injuries. In this study, hair follicle samples were harvested in the rostral region of canine fetuses, divided into three distinct groups, according to the stage of pregnancy, as follows: Group I = 30 days, Group II = 35 days, Group III = 40 days. These samples were grown in 75 cm² Petri dishes with 5 mL of DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics 1% streptomycin / penicillin. Cells were frozen and thawed and used in procedures for analysis of expression of markers of stem cells: STRO-1, CD 117, OCT 3/4, CD 90, Nanog, CD- 34, SSEA -4, CD- 105, MCP-1, HSP-47, CD 1 A, VEGF-R1, DR4, IL-1 β , caspase-3, Ki-67, CD -45. The choice of antibodies was based on studies that showed affinity and avidity to the hair follicle. In addition, for purposes of characterization of the hair follicle, procedures for immunohistochemistry and PCR analysis with the marker S100 and immunocytochemistry with the markers OCT3/4, VEGF, STRO-1, CD117 e Nanog were used. The results suggested that hair follicle cell line of fetal dogs showed satisfactory growth using the DMEM high medium supplemented with 10% inactivated FBS and 1% antibiotics and could be maintained and expanded in culture. The growth and expansion of stem cells of the hair follicle are unique because they occur around the hair shaft using it as anchorage. Results also indicated pluripotency features in the hair follicle stem cells through the positive expression of Oct3/4, Nanog, CD105, CD90, SSEA-4 and STRO-1, in all groups. Regarding the proliferation rate and cell cycle phase, distribution and cell death

aspects, HSP47, DR4 were used. To verify angiogenesis, VEGFR1, Ki67 and Caspase-3 were expressed in all groups. In Immunohistochemistry procedures we observed the expression of S100, and in mRNA on RT-PCR. We concluded in this study that in group III the expression of S100 was higher than in the two other groups. In addition, we found that the pluripotency of the stem cells was indicated by the expression of the markers OCT3/4, Nanog, CD105, CD90, SSEA-4 and STRO-1.

Keywords: Stem cells. Hair follicle. Fetuses. Dog.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
3	MATERIAL E METODOS	21
3.1	FETOS CANINOS	21
3.2	SEPARAÇÃO E OBTENÇÃO DAS CÉLULAS	21
3.3	CONGELAMENTO CELULAR	22
3.4	DESCONGELAMENTO CELULAR	23
3.5	EXPANSÃO CELULAR	23
3.6	CITOMETRIA DE FLUXO	24
3.7	ANÁLISE DAS FASES DO CICLOS CELULARES	25
3.8	IMUNOCITOQUÍMICA	25
3.9	MICROSCOPIA DE LUZ - IMUNOHISTOQUÍMICA	26
3.10	ANÁLISE DE RT-PCR	26
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	30
4.1	CARACTERÍSTICAS DA CULTURA CELULAR	30
4.2	CITOMETRIA DE FLUXO	35
4.3	IMUNOCITOQUÍMICA	41
4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	43
4.5	ANÁLISE DE RT - PCR	43
4.6	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR	44
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O cão é o mais antigo companheiro animal do homem, sendo a sua domesticação estimada em milhares de anos, como comprovam ossadas encontradas em sítios arqueológicos, além das gravuras e pinturas rupestres. Até o momento, a mais antiga ossada de um cão foi encontrada em Oberkassel, na Alemanha, e é datada em 14.000 anos. Os romanos foram os primeiros a criar cães sistematicamente e registrar as características das diferentes raças. O cão doméstico (*Canis familiaris*) apresenta um polimorfismo inédito dentro de uma única espécie. A sua origem e evolução ainda é largamente discutida, mas é indiscutível o sucesso de sua parceria com o homem tanto no trabalho como no lazer. O conhecimento da medicina humana foi adaptado à medicina veterinária para os cães. Daí a importância de se aprofundar os estudos anatômicos desta espécie (EVANS, 1993; LAROUSSE, 2005).

A pele e o pelo se tornaram objetos de estudos mais específicos atualmente. A pele é responsável pela produção de suor, termoregulação e como barreira de proteção contra uma variedade de agressões. A perda da integridade da pele ou seus apêndices acompanha, em geral, traumas, cirurgias ou anormalidades, como insuficiência vascular, hipertensão ou distúrbios metabólicos (HANSON et al., 2010). Nos últimos anos a identificação de populações de células dermais tem atraído a atenção dos cientistas por sua fácil acessibilidade e características de pluripotência, criando, inclusive, novas possibilidades de aplicações clínicas.

O presente projeto objetiva estudar a obtenção e caracterização de células-tronco a partir das culturas de células do folículo piloso de cães. O estudo se concentra na capacidade proliferativa e cinética de crescimento celular, com a expressão dos marcadores celulares. Espera-se que este trabalho possa contribuir para a ampliação de possibilidades terapêuticas, com a utilização de células-tronco provenientes do folículo piloso na reparação capilar e de lesões da pele.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pele, ou tegumento, é o maior órgão do corpo dos vertebrados na medida em que recobre toda a sua superfície e representa a barreira física entre o ambiente e o organismo. Exerce uma série de funções importantes impedindo a perda de líquidos, regulando a temperatura do corpo e protegendo os tecidos moles subjacentes da invasão de microorganismos oportunistas, além de refletir um número de distúrbios sistêmicos presentes em certas moléstias metabólicas, virais, inflamatórias e endócrinas. Na clínica veterinária, o exame da pele é fundamental em qualquer exame físico completo (CARLYLE et al., 2000).

Hoje em dia, graças a pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas, temos um nível de informação que nos permite atribuir à pele um número maior de funções do que apenas a de barreira protetora. A interação dos diversos componentes normais da pele e outros sistemas do organismo, principalmente o sistema imune, é um processo muito complexo, particularmente no que diz respeito às funções moleculares, fisiológicas e celulares que ocorrem na pele. A descoberta de componentes celulares que atuam de forma específica em respostas imunes a diversos antígenos e a melhor compreensão do papel exercido por componentes específicos, como os ceratinócitos, por exemplo, nos permite concluir que a pele desempenha funções importantes no sistema de vigilância imune global (CARLYLE et al., 2000).

O pelo é uma característica dos mamíferos, pois na maioria das espécies a pelagem se espalha pelo corpo, com exceção de algumas regiões bem delimitadas. Assume uma variedade de formas intermediárias, mas a distinção principal recai sobre três categorias: pelos de revestimento, pelos de subcobertura e pelos táteis de distribuição restrita e associada a receptores táteis. Cada pelo cresce a partir de um minúsculo orifício ou folículo e se protraí para a superfície da cútis (DYCE et al., 2010).

A raiz do pelo é formada pelas células que recobrem a papila dérmica, e é o ponto de onde emerge o eixo do pelo. Na fase de crescimento, as células da raiz

multiplicam-se e diferenciam-se em vários tipos celulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Uma variedade de pelos está associada a diferentes áreas do corpo. Com relação àqueles que fazem parte do tegumento geral, podemos dizer que há dois tipos básicos: o pelo primário e o pelo secundário. O pelo primário é o maior deles, no que diz respeito ao diâmetro e ao comprimento, e normalmente está profundamente implantado na derme. As glândulas sebáceas, as sudoríparas e o músculo piloerector são diretamente associados ao pelo primário. O pelo secundário, também conhecido como subpelo, é mais superficialmente implantado na derme do que o pelo primário, e carece de ligações com as glândulas sudoríparas e com o músculo piloerector.

Segundo Samuelson, os pelos são formados pelos folículos pilosos, que não passam de invaginações da epiderme que invadiram a derme e mesmo a hipoderme. Na base do folículo piloso está localizada a raiz do pelo e uma papila dermal adjacente, a qual se sobreleva para a raiz. A raiz do pelo e a papila dermal podem ser coletivamente chamadas de bulbo piloso. A papila dermal possui um pequeno plexo de vasos sanguíneos (capilares) que nutrem a raiz. A porção mais profunda da raiz, próxima à papila, é a matriz do pelo, formada por células densamente compactadas que se proliferam e são responsáveis pelo crescimento do pelo. As células da matriz do pelo constituem uma forma especial da camada basal da epiderme. As células derivadas desta porção da raiz do pelo se diferenciam daquelas da epiderme típica pela composição da queratina formada. Ao invés de criar queratina que possui uma fase de queratohialina e produz materiais lipídeos que mais tarde serão liberados, como acontece com os queratinócitos, as células da matriz formam uma queratina sem queratohialina, mas que é rica em conteúdo sulfúrico e imersa em pouco lipídio. As células queratinizadas resultantes são consideravelmente mais duras e mais resistentes ao estresse mecânico que as células queratinizadas da epiderme.

As células localizadas na porção central da matriz do pelo formam a medula, ou seja, o âmagio do pelo, composto por grandes células, de formato cubóide, e que se tornam menos compactas à medida que se afastam da raiz. Apenas pelos primários possuem uma medula. As células que envolvem a medula e que, portanto, se localizam ligeiramente adjacentes ao centro da matriz, dão origem ao córtex do pelo. Estas células tornam-se queratinizadas da forma já descrita anteriormente,

formando a queratina “dura”. Do lado externo do córtex do pelo, uma linha única de células dentro da matriz periférica forma a cutícula do pelo. A cutícula consiste de células queratinizadas achatadas que se sobrepõem umas às outras e formam o limite externo do pelo quando exposto ao ar.

Melanócitos residem na raiz do pelo próximo à papila dermal. Quanto à sua densidade, eles podem estar especialmente concentrados nesta região do integumento e são responsáveis pela coloração do pelo do animal. Melanócitos com alto teor de feomelanina originam a pelagem caramelo, amarela, ruiva ou castanho-ruiva, enquanto que melanócitos com alto teor de eumelanina originam pelagem marrom escura a negra.

A porção periférica do bulbo piloso no nível da matriz é delimitada por uma bainha da raiz, a qual é dividida em porção externa e interna. A porção externa da bainha da raiz consiste inicialmente de uma camada única de células ao longo da base do bulbo, mas que aumenta rapidamente para várias camadas em direção à superfície. Externamente à bainha externa fica a lâmina basal, chamada de membrana translúcida e que é confluenta com os lumens basais à medida que a bainha externa da raiz se torna confluenta com a epiderme. Internamente à bainha externa da raiz e do lado externo da matriz, encontramos uma bainha interna da raiz que é formada de três componentes. Inicialmente, a camada de Henle ou camada epitelial pálida, a qual é uma única camada externa de células cubóides que se localiza contra a porção mais profunda da bainha externa. Outro componente é a camada de Huxley, ou camada epitelial granular, a qual pode consistir de uma ou duas camadas de células achatadas contendo grânulos de trichialina. Por fim, a cutícula da bainha interna da raiz, composta de células em forma de escamas, que se sobrepõem umas às outras e formam o revestimento externo do pelo. Todas as porções que fazem parte do pelo dentro do folículo piloso são chamadas de raiz do pelo, e a porção que se estende acima da epiderme é chamada de eixo do pelo (SAMUELSON, 2007).

Os folículos pilosos podem ser divididos em dois tipos: folículos simples, também conhecidos como folículos únicos, e folículos compostos. Os folículos simples possuem uma única haste pilosa emergente para a superfície, enquanto que os folículos compostos possuem mais de uma haste pilosa emergindo de um orifício único. Os folículos compostos estão agrupados densamente e, como resultado, compartilham não só o mesmo orifício como também as glândulas auxiliares. Não é

incomum observarmos um pelo primário cercado e reforçado por pelos secundários deste modo. Os folículos simples podem ser encontrados variavelmente distribuídos ou agrupados, dependendo da espécie animal e da localização do folículo pelo corpo. Variações também podem ser observadas entre animais com folículos compostos em relação ao número de pelos primários e secundários associados a cada folículo. Além dos folículos comuns descritos acima, existem formas especializadas que dão origem a pelos modificados especificamente para recepção sensorial tátil.

Estes pelos são conhecidos como pelos tácteis, pelos de sínus ou vibrissas, que são encontrados nas cavidades nasais e perioralmente ao longo do focinho de mamíferos domésticos. Vibrissas tem um amplo diâmetro e podem ser longas. Sua composição e origem são basicamente idênticas a dos pelos primários em folículos únicos. Entretanto, a construção do tecido conectivo adjacente ao folículo é bastante diferente. A principal característica diferenciadora é a presença de bainhas dermais bem formadas contendo um sínus vascular entre a sua camada externa e interna. O próprio sínus pode ser dividido, por suas diferenças morfológicas, em porção superior e inferior. A porção superior possui um sínus vascular anular ininterrupto (sem trabéculas), enquanto a porção inferior possui uma rede de trabéculas de tecido conectivo, cercada por sangue na sua câmara cavernosa. Dentro da camada interna da bainha dermal, a bainha externa da raiz do folículo é revestida por uma espessa membrana basal (membrana translúcida). Em cães e gatos a camada interna da bainha dermal dentro da região do sínus anular (não trabeculado) espessa-se a ponto de preencher o sínus. Uma variedade de inervações está associada às vibrissas, incluindo terminações nervosas livres e discos de células de Merkel táteis (SAMUELSON, 2007).

Existe uma grande variabilidade no pelo do cão quanto ao seu comprimento, coloração, diâmetro e contorno transversal, entre as várias raças de cães e mesmo entre indivíduos da mesma raça. Brunsch (1956) classificou o pelo dos cães em seis tipos:

Pelos lisos (tipo 1) - São pelos cerdáceos e firmes, normalmente profundamente pigmentados, e ocasionalmente chamados de pelos protetores, pelos primários e pelos de cobertura. Este é o pelo mais forte e é o pelo principal em um feixe de folículos. Normalmente, é também o pelo mais longo e a haste é lisa ou curvada. Possui uma medula espessa e um córtex fino.

Pelos cerdáceos (tipo 2) - São pelos semelhantes a cerdas, com ponta áspera, mas mais fraco e suave próximo à base. O terço distal é semelhante ao tipo descrito anteriormente, mas os próximos dois terços podem ser ligeiramente ondulados. No pelame é difícil distinguir este tipo do tipo 1, já que a medula é apenas ligeiramente menos espessa. O pelo cerdáceo é mais curto do que o pelo liso, mas é considerado como um subpelo ou pelo protetor. Este tipo de pelo pode ser o pelo principal em um feixe, mas normalmente é um pelo subsidiário ao tipo 1.

Pelos cerdáceos ondulados (tipo 3) - Este tipo é mais fino e curto do que o tipo 2. É um pelo ondulado com cerdas bem desenvolvidas. Formam os maiores pelos subsidiários, mas são normalmente incluídos como pelos protetores. A medula e o córtex são menores do que no tipo 2, mas o córtex é ligeiramente mais pesado.

Pelos ondulados cerdáceos (tipo 4) - Este é um pelo longo, macio, mais curto e fino do que o tipo 3, com cerdas pouco desenvolvidas e uma medula menor. É ondulado nos dois terços inferiores da haste. Este tipo de pelo representa o maior pelo do subpelo.

Pelo ondulado grande (tipo 5) - Este tipo é mais curto e fino do que o tipo 4, e a haste é muito ondulada, com uma pequena cerda na ponta. A medula é bem pequena e pode ser descontínua. O córtex é relativamente espesso, sendo que este tipo de pelo empresta uma sensação felpuda ao subpelo.

Pelo ondulado fino (tipo 6) - Este tipo é mais curto e fino do que o tipo 5, e é ocasionalmente descrito como lanugem. A medula é descontínua ou ausente. Este tipo representa o pelo menor e mais fino do subpelo e normalmente é ondulado, com uma cerda pequena e pouco desenvolvida na ponta (EVANS, 1993).

As células-tronco da epiderme e dos folículos pilosos têm sido bem estudadas nas últimas décadas e a identificação de populações de células multipotentes dos tecidos dermais tem atraído a atenção nos últimos anos. A pele pode servir como um local de reserva para várias populações de células-tronco, incluindo células-tronco comprometidas e pluripotentes, ambas em tecidos dermal e epidermal. Devido à sua fácil acessibilidade, células-tronco na pele não só promovem um modelo experimental para a biologia da pele, mas também promovem um modelo experimental para o estudo da interação epitelial-mesenquimal de vários outros órgãos fora da pele (CHUMENG et al., 2004).

A caracterização e manipulação das células-tronco têm levado a várias aplicações clínicas. Por exemplo, a caracterização das células-tronco

hematopoéticas levou a transplantes autólogos periféricos de células-tronco e terapia genética (MORRIS et al., 2004). Semelhantes avanços no tratamento da perda de pelos e outras doenças de pele e couro cabeludo são dependentes do isolamento e do estabelecimento do perfil genético das células-tronco do folículo piloso. Usando um sistema dedutivo de análise de linhagem para identificar as células do bulbo e sua progênie, Morris et al. demonstraram que essas células dão origem a todas as camadas epiteliais do folículo recém gerado durante o ciclo normal do folículo piloso, fornecendo a primeira prova genética de que células do bulbo são os ascendentes do epitélio folicular inteiro (MORRIS et al., 2004). Seguindo esta linha de pesquisa, estudos da multiplicação de pelos vêm sendo realizados. Em 2006, Intercytex, uma empresa de pesquisa independente, testou um método confiável de multiplicação de folículos pilosos, removidos da nuca, para reimplantar as células no escalpe para recrescimento do pelo. Em outro estudo, completado em 2008, resultados positivos foram anunciados na clonagem baseada na multiplicação do pelo, conhecida como boa implantação folicular (YOO et al., 2010). Nos últimos anos, estudos foram realizados utilizando-se principalmente o folículo piloso de vibrissas e pelos táteis de roedores. Autores como Reynolds e Jahoda (2004), Inamatsu et al. (2006), Nakao et al. (2007) utilizaram folículos pilosos de vibrissas e células da papila dermal, obtidas de vibrissas, em diferentes estudos em interações interespecies e indução do folículo piloso (REYNOLDS; JAHODA, 2004; INAMATSU et al., 2006; NAKAO et al., 2007).

Culturas de queratinócitos e marcadores de queratinócitos em cães já foram desenvolvidos e estudados (SUTER et al., 1991). A identificação das células-tronco pelas propriedades do ciclo celular tem limitações. Vários grupos de pesquisa empreenderam esforços extensivos para definir marcadores de células-tronco específicos. A maioria destas pesquisas concentrou-se na região do *bulge* (AMBLER; MÄÄTTÄ, 2009). Apenas alguns marcadores são expressos nas células do *bulge* nas espécies humana e murina, incluindo o CD 200, tenascin C, citoqueratina K15 e citoqueratina K19 (OHYAMA et al., 2006).

Estudos mais recentes revelam que as células-tronco epidermais expressam marcadores bem definidos, já que estes estudos demonstraram a expressão diferenciada dos marcadores no folículo piloso e na epiderme interfolicular humana. Em cães, os marcadores CD34, nestina e citoqueratina 15 (K15) foram considerados marcadores de células-tronco do folículo piloso (BRACHELENTE et al., 2013). Foi

descrita a expressão de seis marcadores (CK15, CK19, PHLDA1, CD200, nestina e Ki-67) através de imunohistoquímica em amostras embrionárias e fetais de unhas humanas. Foi proposto pelos autores que, durante a embriogênese, a dobra proximal ventral da unha representa o nicho das células tronco da unha (SELLHEYER; NELSON, 2012).

Para se obter um método de cultura de órgão para a expansão e isolamento de células-tronco do folículo piloso de ratos de uma única biópsia de pele, os resultados de PCR e coloração imunofluorescente revelaram que as células-tronco obtidas do *bulge* tiveram alta expressão na camada basal dos marcadores CK14, CK15, p63 e integrina alfa 6, demonstrando que as células-tronco multipotentes do folículo piloso poderiam ser eficientemente colhidas de uma cultura de órgãos de um material de pele limitado, até mesmo um único folículo piloso, podendo reconstituir vários folículos pilosos *in vivo* depois de seu cultivo e expansão (ZHANG et al., 2012).

Visando demonstrar que as células-tronco do folículo piloso de pelos táteis de ratos Wistar e da medula óssea compartilham várias características em comum, foram utilizados os anticorpos CD 34, CD44, CD73 e CD 90. A citometria de fluxo demonstrou que as células dermais do folículo piloso expressaram marcadores da medula óssea (CD 44, CD73, CD90) em proporções semelhantes (HOOGDUIJN et al., 2006). Observou-se uma população de leucócitos ao redor dos folículos pilosos de camundongos, e um grande número destes leucócitos CD45⁺ propagam-se *in vivo* (KUMAMOTO et al., 2003).

A expressão e a função do fator de crescimento endotelial (VEGF), um dos principais reguladores fisiológicos da vasculogênese, foram mediadas pelo VEGF-receptor-2 nas células da bainha externa do pelo humano (LI et al., 2012). Outro marcador hematopoiético utilizado em nosso estudo, o IL1 β , exerce, juntamente com o hormônio estimulador α de melanócitos α -MSH, um papel nas atividades estimulantes da pigmentação do pelo sob condições pró-inflamatórias (MEYER et al., 2009).

Em nosso estudo, além dos vários marcadores de células tronco, utilizamos o marcador S-100, que já é conhecido como um marcador relacionado com o crescimento folicular do pelo. Contudo, em um estudo recente para se conhecer o potencial das células precursoras multipotentes derivadas da pele humana,

observou-se alta expressão do marcador S-100 β nestas células e a alta deposição de cálcio nas mesmas (HILL et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FETOS CANINOS

Na cultura celular do folículo piloso, foram utilizados fetos de cães com idade gestacional entre 30 e 40 dias, aproximadamente, provenientes de campanhas de castração de programas da Saúde Pública do Estado de São Paulo, Brasil. O procedimento de coleta foi de acordo com os protocolos do Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo nº 3041/2013. Foram utilizados, no total, três grupos de fetos de úteros em diferentes fases de gestação, os quais foram divididos da seguinte maneira: Grupo I (CR= 8 cm) – 6 fetos (idade gestacional 30 dias aproximadamente), Grupo II (CR= 8,5 cm)– 6 fetos (idade gestacional 35 dias aproximadamente) e Grupo III (CR= 12 cm) - 4 fetos (idade gestacional 40 dias aproximadamente). A idade gestacional desses fetos foi estimada através de medição com um paquímetro, seguindo os critérios desenvolvidos e estabelecidos por Evans e Sack (1973).

3.2 SEPARAÇÃO E OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

A obtenção das amostras foi realizada com auxílio de uma pinça e tesoura estéril, através de uma incisão em forma de V na região labial do focinho. As amostras foram transferidas para uma placa de Petri de 75 cm² estéril. Em seguida, estas amostras foram lavadas em solução de PBS(Sigma Aldrich®73173-1L) com 2mL de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich® 10mL/L P4458). Após este procedimento as amostras foram transferidas para outra placa de petri estéril, a qual foi preenchida com 5mL de meio de cultivo DMEM (Dulbecco

ModifiedEssentialMedium High Glucose), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich® F6178) e 1% de estreptomicina/penicilina. Estas amostras sofreram, em seguida, uma debridaço com auxlio de duas lâminas de bisturi estreis e logo aps este procedimento ocorreu a maceraço com auxlio do mbolo de uma seringa de 10mL estril.

O material resultante, aps aplicaço desta tcnica, foi dividido em dois tubos Falcon estreis de 50mL cada, um contendo tripsina (3mL) (Sigma Aldrich® T4674) e o outro contendo collagenase tipo 1 1mg/mL (2 mL) (Sigma Aldrich® C9722). Os tubos foram levados ao banho-maria para o processo de digesto durante 20 minutos, sendo homogeneizados a cada 10 minutos. Aps esta etapa, as amostras para cultivo celular foram divididas em placas de Petri de 2,0 cm² estreis com 2mL de meio de cultivo DMEM (Dulbecco ModifiedEssentialMedium High Glucose), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina e incubadas a uma temperatura de 37C, com umidade relativa prxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. A cmara de fluxo laminar foi sempre previamente esterilizada com lcool 70% e UV durante 20 minutos.

As clulas do Grupo I foram cultivadas durante um ms; as clulas do Grupo II foram cultivadas durante 23 dias; e as do Grupo III foram cultivadas durante 10 dias, tendo-se, assim, obtido diferentes estgios de desenvolvimento das clulas-tronco.

Em todos os grupos foi adicionado 1mL de meio DMEM completo uma vez por semana para fomentar o crescimento das clulas. As culturas foram fotografadas para acompanhar o crescimento e o desenvolvimento das clulas do folculo piloso.

3.3 CONGELAMENTO CELULAR

A cultura das clulas provenientes do cultivo do tecido do folculo piloso sofreu desagregaço enzimtica com tripsina a 0,25%. O "pellet" celular foi ressuspndido em meio de congelamento. O meio utilizado foi composto por SFB e 10% de DMSO, sendo posteriormente distribudo em criotubos (1 mL da suspenso

para cada criotubo). Os criotubos permaneceram em isopor com gelo triturado, durante todo o processamento da amostra.

Seguindo este procedimento, os criotubos com meio de congelamento passaram pelo protocolo: 30 minutos a -4°C , 4 horas a -20°C , 12 horas a -40°C para, depois, serem transferidos para um tambor de nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados a uma temperatura de -196°C .

3.4 DESCONGELAMENTO CELULAR

Os criotubos foram retirados cuidadosamente do tambor de nitrogênio líquido e descongelados, adicionando meio de cultura à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram transferidas para tubos tipo Falcon, aos quais foi adicionado meio de cultivo com 10% de SFB. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 5 mL de meio de cultivo suplementado com 10% SFB, e posteriormente transferido para um tubo Falcon de 15mL.

3.5 EXPANSÃO CELULAR

As células descongeladas foram postas em meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%, colocadas em garrafas de cultivo e guardadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Conforme o desenvolvimento das células, foi adicionado 1mL de tripsina às garrafas, o conteúdo foi centrifugado, parte do “pellet” foi ressuscitado em meio DMEM high com 5 mL de SFB e 1% de estreptomicina e penicilina e distribuído em novas garrafas de cultivo com meio DMEM e outra parte foi suspenso em meio definido de queratinócitos KSFM (Serum Free Medium - Gibco® Life technologies™) com 1% de penicilina/estreptomicina e distribuído em novas garrafas de cultivo com o meio KSFM. Estas garrafas foram então armazenadas em estufas a 37°C com 5% de CO_2 .

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Após o descongelamento, o “pellet” (10⁶ células) foi colocado em tubos tipo Falcon de 15 mL e todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O tubo foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos para a formação de precipitado celular. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de solução salina 0,9% para lavagem e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante e acrescentado tampão, adicionados 250 µL FACSFlow; a suspensão foi transferida para 40 tubos de citometria e, para análise dos marcadores de células-tronco, foram acrescentados os anticorpos: STRO-1 (Abcam® ab 102969), CD 117 (Abcam® ab 5616), OCT 3/4 (Santa Cruz® Sc5279), CD 90 (Abcam® ab 23894), Nanog (Abcam® ab 21624), CD 34 (Abcam® ab 81289), SSEA-4 (Abcam® ab 16287), CD 105 (Abcam® ab 11414), MCP-1 (Abcam® ab 21396), HSP-47 (Abcam® ab 54874), CD 1 A (Abcam® ab 24005), VEGF R1 (Abcam® ab 32152), DR4 (Abcam® ab 9809), IL-1 β (Abcam® ab 2105), caspase-3 (Santa Cruz®), Ki-67 (Abcam® ab 15580), CD 45 (Sigma® F4149). A escolha dos anticorpos foi baseada em estudos que demonstraram afinidade e avidéz do folículo piloso com esses anticorpos (Quadro 01). Foi adicionado TRITON 0,1 % para a permeabilização dos anticorpos STRO-1, OCT3/4, HSP47, Caspase-3 e Ki-67. As amostras foram distribuídas em vários frascos, contendo uma quantidade de amostra de 300 µL por frasco, acrescida de 200 µL de um tipo de anticorpo descrito acima para cada frasco. Os frascos foram enumerados para uma melhor identificação dos anticorpos. Foi adicionado 5 µL/ tubo de anticorpo secundário AlexaFluor® 546 goat anti-mouse IgG (H + L) (Life Technologies A-1103). As amostras, em seguida, foram analisadas em aparelho para citometria (Citômetro). As imagens foram gravadas para posterior documentação e análise.

3.7 ANÁLISE DAS FASES DOS CICLOS CELULARES

As células em cultivo foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em tampão para citometria (FACsFlow - BD). As células foram novamente centrifugadas durante 3 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante, descartado. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1mL de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas a uma temperatura de -20° C.

As amostras fixadas e armazenadas previamente foram centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1ml de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução de PI, preparada a partir de 5mL de PBS, ao qual foram adicionados 5µL de triton 100 (0,01% v/v), 50µL de RNase A (2mg/ml) e 20µL de iodeto de propídio (5 mg/mL). Em seguida, a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur foram obtidos em 10.000 eventos e, para análise, foi utilizado o programa WinMdi 2.9.

3.8 IMUNOCITOQUÍMICA

As culturas de células de todos os grupos foram expandidas e fixadas em paraformoldeído 4%. Após este procedimento as células foram lavadas três vezes com PBS e solução tween durante 5 minutos cada vez. O próximo passo foi acrescentar 10 µL de Triton 1% às células para permeabilização da membrana. Foram acrescentados os anticorpos Oct3/4 (1:50 Santa Cruz®), VEGF (1:100 Abcam®), STRO-1(1:100 Abcam®), Nanog (1:100 Abcam®), CD117 (Sigma Aldrich® SAB4700711). Às amostras foi adicionado 1µL de Alexafluor® 568 GoatAnti-RabbitIgG(H+ L) (Life Technologies A11011) e em seguida, foram mantidas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 45 minutos. As amostras foram lavadas com PBS e cuidadosamente lavadas novamente com água destilada.

As amostras foram fixadas com DAB (Diaminobenzidina) e colocadas em lâminas de microscopia.

3.9 MICROSCOPIA DE LUZ- IMUNOHISTOQUÍMICA

Os folículos pilosos foram retirados da região rostral dos fetos caninos para serem processados em técnica de histologia, após serem fixados em solução de paraformaldeído 4% no período mínimo de 48 horas. As amostras sofreram a desidratação em uma série de etanóis de concentração crescente de 70 a 100%. Só então foram diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast®.

Após a inclusão, foram feitos cortes de 5µm de espessura. Em seguida, os cortes foram aderidos em lâminas silanizadas. A imunohistoquímica foi realizada com a utilização, para este procedimento, do anticorpo S-100 A1 (Abbiotec™ Mouse Monoclonal) (1:200) como marcador.

3.10 ANÁLISE DE RT- PCR

As amostras de tecido dos folículos pilosos de fetos caninos dos três grupos estudados foram divididas e colocadas em um frasco com nitrogênio líquido para manter seu congelamento. Após esta etapa, as amostras foram postas num micro desmembrador (Mikro-Dismembrator S®) a uma velocidade de 3.000 rpm para pulverização. Após a pulverização, foi adicionado 1 mL de Trizol® às amostras, que foram transferidas para frascos do tipo Eppendorf. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio às mesmas. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 12,000xg. Após a centrifugação, o “pellet” foi retirado cuidadosamente, e o sobrenadante foi transferido para um frasco, e acrescido de 500 µL de isopropanol. O frasco foi deixado “overnight” para precipitação. Em sequência, foi adicionado o corante Blue Green® (0,5 µL) às amostras, já sem o isopropanol. As amostras foram colocadas no eletrodo (Bio-Rad® Power-pac) por 20 minutos para a migração Rna do polo positivo para o polo negativo. Após este procedimento, a molécula de DNA

das amostras foi convertida em molécula de CDNA. Para tanto, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, e, em seguida, lavadas em etanol 70% e ressuspensas em água. Em sequência, adicionou-se às amostras 2 µL de buffer com 29 µL de água destilada; 2 µL de Randon com 29 µL de água destilada; 0,8 µL de dntp com 29 µL de água destilada e 1 µL de enzimas com 29 µL de água destilada. Retirou-se, então, 10 µL das amostras, acrescidas com os compostos acima descritos, para, em seguida, centrifugá-las por 1 minuto. As amostras foram aquecidas e resfriadas em sequência à centrifugação no termociclador (ThermalCyclerVeriti-AB AppliedBiosystem) a 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos, e 85°C por 5 minutos, 35 vezes. Após este procedimento, as amostras, já convertidas em CDNA, foram acrescidas a um “mix” composto por: 2 µL de CDNA, 6 µL de TaOx, 0,6 µL de dntp, 1,0 µL de *primer (iniciador), 1,0 µL de *primer (final), 0,2 µL de TAQ e 19,2 µL de água. As amostras foram então centrifugadas por 2 minutos.

*O primer (iniciador) foi completado com 359 µL de água para sua dissolução e o primer (final) foi completado com 368 µL de água para sua dissolução.

Em seguida, os primers sofreram nova diluição, ambos com 20 µL de água para serem acrescidos às amostras, na próxima etapa do procedimento. As amostras, já com o “mix” descrito, foram centrifugadas por 2 minutos. Em sequência, foi adicionado às amostras 153 µL de água destilada, 48,0 µL de tampão, 4,8 µL de dntp, 8 µL de cada primer e 1,6 µL de TAQ em um tubo Eppendorf. Esta mistura foi distribuída entre as amostras na proporção de 28 µL para cada 2 µL de amostra. As amostras foram então homogeneizadas e postas no termociclador a 95°C por 2 horas, 55°C por 1 minuto, 72°C por 5 minutos, por 35 vezes. Depois desta etapa, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos e, em seguida, realizou-se uma nova eletroforese durante 30 minutos para se verificar se houve adesão dos primers às amostras. Em seguida, as amostras sofreram nova centrifugação por 2 minutos, e adicionou-se um novo “mix” composto por: 2 µL de CDNA, 6 µL de Tobx (tampão), 1,0 µL de primer S100 (F e R), 0,6 µL de dntp, 0,2 µL de TAQ e 19,2 µL de água. Adicionou-se 28 µL do “mix” em cada amostra. As amostras foram postas no termociclador a 95°C por 30 minutos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 5 minutos, por 35 vezes. O sequenciamento do primer S100 A1 utilizado foi:

F-AGGTAGCTGCTGCAGACTGA-18

R-TGTTACAGGCCACTGTGAGG-20 CCTCACGTGGCCTGTAACA

As amostras foram centrifugadas por 2 minutos e, em seguida, foi adicionado a elas um “mix” composto por: 1,0 µl de CDNA, 135 µl de Syber, 8,1 µl de primer (F e R) e 100,8 µL de água. Adicionou-se 28 µL do “mix” às amostras. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no leitor de PCR (Rotor-Gene RG3000 CarbettResearch) a 95°C por 3 minutos, a 95°C por 20 minutos, a 60°C por 30 minutos, a 72°C por 30 minutos e a 72°C por 5 minutos.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. Todos os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como nível crítico para significância valores $p < 0,05$. As diferenças significantes entre os diferentes grupos foram indicadas por: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPadPrism versão 5.0. Para análise das células, foi realizada a fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida, acopladas a um sistema de captura de imagem CCD - Sony. As aquisições realizadas por citometria de fluxo foram feitas no programa *Cellquest* processadas para análise pelo programa Win MDI.2.9.

Quadro 1- Marcadores de pluripotência, hematopoiese, proliferação e morte celular

Marcador	tipo	células marcadas (pele e apêndices)	referencia
STRO-1	PLURIPOTÊNCIA	CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS DA GENGIVATANG et al.,2011	
CD117(c-Kit)	HEMATOPOIESE	CÉLULAS TRONCO DA EPIDERME INTERFOLICULAR	JIANG et al.,2010
OCT3/4	PLURIPOTENCIA	CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA DERMIE	RIEKISTINA et al.,2009
NANOG	PLURIPOTENCIA	CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA DERMIE	RIEKISTINA et al.,2009
CD34	HEMATOPOIÉSE	CÉLULAS DO BULGE NO FOLÍCULO PILOSO	KOBAYASHI et al., 2009
SSEA-4	PLURIPOTENCIA	CÉLULAS MESENQUIMAIS ISOLADAS DA GENGIVA	TANG et al., 2011
CD 105	PLURIPOTENCIA	CÉLULAS MESENQUIMAIS DO FOLÍCULO PILOSO HUMANO	WANG et al., 2012
CD90	PLURIPOTENCIA	CÉLULAS DA BAINHA DERMAL DO FOLÍCULO PILOSO	MERCATTI et al., 2009
MCP-1 (CCL2)	HEMATOPOIESE	REGULAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LEUCÓCITOS NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE	MASCIA et al., 2003
HSP-47	PROLIFERAÇÃO	FIBROBLASTOS DA DERMIE	JWANG ET AL., 2008
CD1A	HEMATOPOIESE	CÉLULAS DO FOLÍCULO PILOSO RELACIONADAS COM A IMUNIDADE	ASGILLIAM ET AL., 1998
VEGF	PROLIFERAÇÃO	MORTE CELULAR CÉLULAS DA BAINHA EXTERNA DO FOLÍCULO PILOSO HUMANO	LI et al.,2012
TNF-DR4	PROLIFERAÇÃO	MORTE CELULAR CÉLULAS TUMORAIS DA PELE CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA	OMRAN &ATA,2014
IL1 β	HEMATOPOIESE	INIBE O CRESCIMENTO DO FOLÍCULO PILOSO	HOFFMAN ET AL.,1997
CASPASE-3	PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR	INDUZ A APOPTOSE CELULAR JUNTO COM TNF- α	LEI et al., 2012
Ki67	PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR	CÉLULAS DA CAMADA MAIS EXTERNA DO FOLÍCULO PILOSO	EHAMA et al.,2007
CD45	HEMATOPOIESE	CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS NA PAPILA DERMAL	RAPOSIO et al., 2007

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA CULTURA CELULAR

As culturas de células-tronco do folículo piloso foram conduzidas, utilizando-se três grupos de células, submetidos a diferentes períodos de cultura (Grupo I - 30 dias, Grupo II - 20 dias e Grupo III - 10 dias). Após este período de cultura, uma solução de colagenase tipo I a 0,1% foi adicionada ao grupo de células para a separação enzimática. Em nossos resultados, foi possível distinguir duas populações celulares, R1 e R2, em todos os grupos e em todos os períodos de cultura. Deve-se ressaltar o fato de que a população celular R2 foi sendo expressa em todos os períodos de cultura, como demonstra o gráfico 1.

Gráfico 1 – Média das populações das células do folículo piloso de fetos caninos

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráfico de barras representando a média DP DO número de população R1 e R2 nas células do folículo de fetos caninos. ** Diferença entre R1 e R2

O meio de cultivo DMEM – high (DulbecomodifiedEssentialMedium high Glucose) provou ser eficiente no crescimento e desenvolvimento das células do folículo piloso, com uma satisfatória resposta aos aspectos de proliferação e crescimento celular. As células crescem ao redor da bainha do pelo (Figura 1 B).

As linhagens e culturas de células do folículo piloso foram obtidas e cultivadas em placas de Petri estéreis de 75cm² usando o meio de cultura DMEM-high suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de estreptomicina e penicilina. Uma vez por semana, durante duas semanas, foi adicionado 1 ml de meio às culturas para se fomentar seu crescimento. Após este período, o meio de cultura foi trocado uma vez por semana (Figura 1 A-B). Na expansão celular, também foi observado, após o descongelamento das células, que o seu crescimento foi semelhante ao padrão de crescimento das culturas celulares e seu desenvolvimento foi mais lento, na segunda e terceira passagens (Figura 1 C-D). Uma

parte das células, durante a expansão celular, foi cultivada com o meio KSFM (Keratinocyte Serum Freemedium). Observamos que o crescimento celular foi mais rápido e as células apresentaram um aspecto de fibroblasto com este meio de cultivo (Figura 1 E-F).

Figura 1 A-B - Cultura celular do folículo piloso do período de 30 dias de gestação

Fonte; (TOMMASI JR,H. L. P., 2014)

Legenda: Cultura celular do folículo piloso do período de 30 dias de gestação - primeiro dia de cultivo das células (setas). **B.** Células em crescimento ao redor da bainha do pelo (setas) após 13 dias de cultivo. 40X..

Figura 2 C-D - Cultura celular do folículo piloso após expansão

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Cultura celular do folículo piloso após expansão. **C.** período de 35 dias após 13 dias de cultivo. **D.** período de 30 dias após 4 dias de cultivo. 40X.

Figura 2 E-F - Cultura celular do folículo piloso após expansão

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Cultura celular do folículo piloso após expansão. **E**. Período de 30 dias após 8 dias de cultivo . **F**. Período de 30 dias após 10 dias de cultivo. 40X.

4.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de citometria de fluxo foi feita após o crescimento, expansão e congelamento das células do folículo piloso para se mensurar a expressão dos marcadores de células-tronco. Para se medir os marcadores de pluripotência das células tronco do folículo piloso, nós utilizamos os marcadores OCT3/4, Nanog, CD 105, CD90, SSEA-4 e STRO-1 em todos os grupos analisados. Em todos os grupos, a citometria de fluxo demonstrou, que a expressão do SSEA-4 foi significativa, especialmente nos grupos I e II, enquanto no grupo III a expressão foi mantida. O marcador CD 105 também foi expresso no Grupo I e II junto com o SSEA-4. Os marcadores OCT3/4, Nanog, CD90 e STRO-1 demonstrou significante expressão somente no grupo III. A expressão dos marcadores demonstram a pluripotência das linhagens celulares (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Gráficos representativos, demonstrando a expressão dos marcadores de pluripotência

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráficos representativos, demonstrando a expressão dos marcadores de pluripotência nas células do foliculo piloso de fetos caninos do grupo I, II e III

Para se verificar a expressão hematopoiética nas células do folículo piloso foram utilizados os marcadores: CD117, CD34, CD1A, MCP1, IL1 β e CD45R. Nos três grupos analisados, a citometria mostrou que a expressão dos marcadores CD1A e CD34 foi mais acentuada no grupo I do que nos demais grupos. Não houve uma expressão satisfatória do marcador CD45R no Grupo I, em relação aos outros grupos. No grupo II, o marcador IL1 β teve pouca expressão em relação aos demais grupos (Gráfico 3).

Gráfico 3- Gráficos representativos da expressão de marcadores hematopoiético

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráficos representativos da expressão de marcadores hematopoiéticos das células do folículo piloso de fetos caninos do grupo I, II e III

Os marcadores utilizados de proliferação e morte celular das células-tronco do folículo piloso foram:HSP47, DR4, VEGFR, Ki-67 e Caspase-3, nos três grupos por citometria de fluxo.

Os marcadores HSP-47, DR4 e VEGFR apresentaram maior expressão no grupo I do que nos demais grupos. O marcador Ki-67 apresentou maior expressão no grupo III, enquanto demonstrou uma pequena expressão nos demais grupos. O marcador caspase-3 apresentou uma expressão semelhante no grupo I e II (Gráfico 4).

Gráfico 4- Gráficos representativos da expressão de marcadores de proliferação e morte celular

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráficos representativos da expressão de marcadores de proliferação e morte celular das células do folículo piloso de fetos caninos do grupo I, II e III.

4.3 IMUNOCITOQUÍMICA

A imunocitoquímica foi realizada em todos os grupos avaliados. Foi observada a expressão dos marcadores Nanog, Oct3/4, VEGF e STRO-1. A expressão do marcador CD117 também foi observada, mas em menor proporção, em comparação com os outros marcadores usados no estudo (Figura 3).

Figura 3 – Imunocitoquímica do folículo piloso

Fonte: (TOMMASI JR,H.L.P.,2014)

Legenda: Imunocitoquímica do folículo piloso. CD117 obteve uma menor expressão do que os outros marcadores. Núcleo (setas).

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunohistoquímica, foi utilizado o marcador S100A1 nos cortes histológicos do folículo piloso dos fetos caninos dos três grupos utilizados no estudo. Foi observado que no grupo III (40 dias de gestação) houve uma maior expressão do que nos outros grupos. O grupo I (30 dias de gestação) e o grupo II (35 dias de gestação) obtiveram uma menor expressão (Figura 4).

Figura 4- Imunohistoquímica com o marcador S100 do folículo piloso em fetos caninos

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Imunohistoquímica com o marcador S100 do folículo piloso de fetos caninos. A. Grupo I. B. Grupo II. C. Grupo III. 40x. O Grupo III apresentou maior expressão.

4.5 ANÁLISE DE RT- PCR

O nosso objetivo na análise de PCR foi investigar a expressão do gene S100 nos três grupos analisados. Nossos resultados mostraram que o grupo com idade gestacional mais avançada (grupo III = 40dias) obteve uma maior expressão do que os outros grupos, sugerindo que as células do folículo piloso estão em fase de maturação (Gráfico 5).

Gráfico 5- Gráfico de barras mostrando a expressão do gene S100 do folículo piloso

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráfico de barras mostrando a expressão do gene S100 do folículo piloso dos tecidos de fetos caninos. O grupo III (40 dias de gestação) apresentou maior expressão.

4.6 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

Células do folículo piloso dos tecidos de fetos caninos, dos três grupos utilizados no estudo (grupo I - 30 dias, grupo II - 35 dias e grupo III - 40 dias), foram fixadas em etanol e RNA e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em gráficos de barra. O grupo III apresentou uma maior expressão na fase G2/M em relação aos outros grupos, que apresentaram uma pequena diferença na expressão nesta fase. Os grupos II e III apresentaram resultados semelhantes na fase G0/G1 e na fase S. O grupo I apresentou uma expressão um pouco maior, comparado ao grupo II e III, no DNA fragmentado (Gráfico 6).

Gráfico 6- Gráfico de barras demonstrando o ciclo celular do folículo piloso dos tecidos de fetos caninos

Fonte: (TOMMASI JR, H. L. P., 2014)

Legenda: Gráfico de barras demonstrando o ciclo celular do folículo piloso dos tecidos de fetos caninos. O grupo III apresentou maior expressão na fase G2/M. O grupo II e III apresentaram resultados semelhantes na fase G0/G1. * Diminuição da expressão de apoptose, ** G2 elevada resposta e significante proliferação.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O método ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados do PCR e do ciclo celular. Para o PCR observamos os seguintes resultados e diferença estatística:

Grupo I vs Grupo III: 13,52

Grupo I vs Grupo II: 4,386

Grupo II VS Grupo III: 9,133

Os resultados para o ciclo celular mostraram um valor significativo de $p < 0,0001$ para todos os grupos analisados. Na citometria de fluxo observamos uma diferença da expressão em alguns marcadores, com uma variável de significância ($P < 0.05$). O CD117 obteve uma expressão menor no grupo I em comparação com o

grupo II (-20,84 para -3,163)* ($p<0,05$) e com o grupo III (-23,54 para 5,863)* ($p<0,05$). O CD34 obteve uma expressão maior no grupo I do que no grupo III (11,18 para 44,62)* ($p<0,05$). O marcador IL1- β obteve uma expressão maior no grupo II em comparação com o grupo I (-40,29 para -21,71)** ($p<0,01$) e com o grupo III (2,659 para 21,24)* ($p<0,05$). O grupo I obteve uma menor expressão do que o grupo III (-28,34 para -9,79)** ($p<0,05$). O marcador STRO-1 obteve uma maior expressão no grupo III em comparação com grupo II (-43,20 para 14,30)** ($p<0,01$) e com o grupo I (-32,90 para -4,001)* ($p<0,05$). O marcador OCT 3/4 obteve uma maior expressão no grupo III em comparação com o grupo II (-38,16 para -13,34)** ($p<0,01$) e com o grupo I (-32,16 para -7,441)* ($p<0,05$). No marcador CD90 foi observada uma expressão menor no grupo I em comparação com o grupo II (-30,24 para 12,56)** ($p<0,01$) e com o grupo III (-46,84 para -29,16)*** ($p<0,001$); o grupo III obteve uma maior expressão comparado com o grupo II (-25,44 para -7,763)** ($p<0,01$).

O marcador Nanog obteve uma maior expressão no grupo III do que no grupo I (-39,08 para -26,12)*** ($p<0,001$) e no grupo II (-18,58 para 5,617)** ($p<0,01$). O grupo I obteve uma menor expressão em comparação com o grupo II (-26,28 para 14,02).

O marcador Ki- 67 obteve uma maior expressão no grupo II, comparado com o grupo I (-43,73 para -27,07)*** ($p<0,001$) e com o grupo II (-38,33 para -21,67). O DR4 obteve uma expressão mais alta no grupo I do que no grupo II (2,69 para 21,12)* ($p<0,05$) e no grupo III (5,229 para 23,67)* ($p<0,05$). O marcador VEGF obteve uma expressão mais alta no grupo I do que no grupo III (0,8094 para 13,29)* ($p<0,05$).

5 DISCUSSÃO

O estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar e cultivar as células do folículo piloso de fetos caninos para contribuir para futuras possibilidades de aplicações terapêuticas de transplante e tratamento de afecções da pele e anexos cutâneos. Em nosso estudo, utilizamos o cão como modelo, já que cães possuem algumas patologias de pele semelhantes aos seres humanos, como por exemplo, a Alopecia Areata (AA), e, dessa forma, amplia o leque de possibilidades. Observamos que o crescimento das células do folículo piloso se deu de uma forma peculiar, ao redor da haste pilosa. De uma forma geral, o crescimento celular foi relativamente rápido, após uma semana de cultivo. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em culturas de células dos folículos piloso de ratos, nas quais foi observada uma rápida proliferação, formando uma camada de células num período de 2 a 4 semanas (DREWA et al., 2009).

Para manutenção do crescimento celular e das células do folículo piloso foi adicionado meio de cultura DMEM completo, uma vez por semana. Não houve necessidade de se adicionar complementos, como o FGF 2 (fator de crescimento de fibroblastos-2) ou o DSFK (fator de crescimento de queratinócitos) para o desenvolvimento da cultura celular, como foi feito em outros experimentos conduzidos no mesmo campo de estudo (GHO et al., 2004; OSADA et al., 2007; DREWA et al., 2009).

Na pele adulta, cada folículo piloso contém um nicho estromal de células encontrado no *bulge*, o qual pode ser usado para reparar folículos em cada ciclo do pelo e lesões da pele (BLANPAIN et al., 2004). O folículo piloso apresenta uma variedade de tipos celulares. Estudos identificaram células hematopoiéticas no folículo piloso de camundongos capazes de repopular o sistema eritróide (LAKO et al., 2002). Em outro estudo, foi identificada uma população de células hematopoiéticas no folículo piloso humano (LAKO et al., 2002; SHI et al., 2004). Este fato não foi evidenciado em nosso estudo, mas observamos a expressão de alguns marcadores hematopoiéticos nos grupos analisados.

Devido ao fato de uma variedade de células originadas no folículo piloso se concentrarem em nichos, nós utilizamos diferentes tipos de marcadores para a

caracterização celular em nosso estudo. Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram que, nos fetos caninos, existe um crescimento de células com características pluripotentes. A maioria delas expressa pelos marcadores SSEA-4, CD105 e CD90.

O marcador SSEA-4 já foi utilizado em vários estudos. Em um estudo descrevendo a reprogramação de células-tronco mesenquimais do folículo piloso humano em células-tronco pluripotentes induzidas, foi observado que as células do folículo piloso expressaram, em sua maioria, os marcadores CD105 e CD90, numa proporção de 84,4% e 99,5%, respectivamente (WANG et al., 2013). A expressão do marcador SSEA-4 foi demonstrada em células-tronco mesenquimaisdermais adultas (2,9%), tecido adiposo e do coração (RIEKISTINA et al., 2009). Em nosso estudo houve uma alta expressão do marcador SSEA-4 no grupo I, devido ao fato de serem animais mais jovens do que nos outros dois grupos, sugerindo uma alta expressão da presença de células-tronco. A expressão dos marcadores SSEA-4 e STRO-1 foi estudada em tecidos gengivais humanos normais e hiperplásicos. Ambos os tecidos demonstraram serem positivos para estes marcadores, e o controle isotipiconão apresentou coloração positiva, indicando assim, que os dois tipos de tecidos analisados possuem células de conexão, com semelhanças a células mesenquimais (TANG et al., 2011). Nós observamos uma maior expressão do marcador STRO-1 no grupo III.

O marcador CD90, o qual obteve importante expressão em nosso estudo, foi demonstrado na bainha dermal de folículos pilosos de cães e em células-tronco dermais de folículos pilosos de *scalps* humanos (MERCATI et al., 2009; JIANG et al., 2010). Este marcador de células mesenquimais foi também observado em células-tronco do folículo piloso dermais dos pelos tácteis de ratos, em um estudo comparando estas células com células mesenquimais derivadas da medula óssea, numa proporção de 96% (HOOGDUJIN et al., 2006). Foi também demonstrado que o CD90 reconhece populações de células-tronco de queratinócitos enriquecidos de pele humana *in vitro* e *in vivo* (NAKAMURA et al., 2006). No presente estudo, observamos o CD90 com uma alta expressão nas células do grupo III e uma baixa expressão nas células do grupo I.

Observamos que o marcador Nanog obteve uma maior expressão nas células no grupo III em relação ao grupo I. Este marcador mesenquimal foi observado em culturas celulares da derme de amostras de pele humana (RIEKISTINA et al., 2009).

A expressão do marcador hematopoiético CD34 foi já demonstrada em células do folículo piloso de camundongos e cães adultos (TREMPEUS et al., 2003; PASCUCCI et al., 2006). Em adição a este estudo, foi demonstrado que os queratinócitos derivados do folículo piloso são diferentes dos queratinócitosepidermais (KOBAYASHI et al., 2009). Células CD34+ parecem não ser encontradas em folículos pilosos humanos; apenas uma discreta imunoreatividade foi encontrada na bainha externa do pelo (OHYAMA et al., 2006; KLOEPPER et al., 2008). Em outro estudo, foram descritas células CD34+ em uma parte das células do *bulge*, no topo de folículos pilosos humanos (RAPOSIO et al., 2007). Observamos uma alta expressão do CD34 no grupo I (período de gestação de 30 dias), o grupo mais jovem. O marcador CD1A tem uma alta expressão em células jovens. Este marcador expressa o papel do folículo piloso nos aspectos imunitários da pele. Uma pequena expressão deste marcador foi observada nas células de Langherans e em amostras de pele submetidas à irradiação UVB, após 72 horas (GILLIAM et al., 1998). Sua expressão foi observada em biopsias de glândulas sebáceas humanas de *scalps* e pele facial, para se avaliar a distribuição de melanócitos nas glândulas sebáceas (JANG et al., 2014). Em nossos resultados, os marcadores CD1A e CD34 apresentaram uma expressão acentuada no grupo I, devido ao fato que este grupo possui animais mais jovens do que o grupo II e III.

O marcador IL1- β foi sugerido como um inibidor do folículo piloso, junto com a indução do AMP. Ambos possuem uma importante função nas doenças inflamatórias do pelo *in vitro* (PHILPLOT et al., 1996; HOFFMANN et al., 1997). Em nossos resultados o IL1- β apresentou maior expressão no grupo II, quando comparado com os demais grupos.

O marcador de proliferação Ki-67 obteve uma maior expressão nas células do grupo III em comparação ao grupo I e grupo II. Este marcador foi descrito nas estruturas do folículo piloso durante seu desenvolvimento anagenico, e foi detectado na camada mais externa das estruturas do pelo (EHAMA et al., 2007).

O marcador CD45RO não apresentou nenhuma expressão significativa em nenhum dos três grupos analisados. Células mesenquimaisdermais, precursores de células da pele e células do folículo piloso humano também apresentaram uma expressão negativa do CD45 em vários outros estudos (RIEKISTINA et al., 2008; RIEKISTINA et al., 2009; WANG et al., 2013). Raposio et al. observaram uma grande população de células CD45 negativas mas, também, observaram uma pequena população de células CD45 positivas na região do *bulge* em folículos pilosos humanos (RAPOSIO et al., 2007).

Os marcadores de proliferação e morte celular HSP47, DR4 e VGFR2 obtiveram uma alta expressão nas células do grupo I. Os níveis de expressão HSP47 foram mensurados nas duas camadas mais profundas e na camada mais superficial da derme, e foi observada uma alta expressão deste marcador nos fibroblastos das camadas mais profundas da derme (JWANG et al., 2008).

O TNFDR4 (Fator de Necrose tumoral – receptor de morte 4) é um receptor de morte que, quando ativado pelo ligante fator de necrose tumoral relacionado à apoptose (TRAIL) induz a apoptose em células cancerígenas (OMRAN; ATA, 2014). Além disso, foi constatado que o anticorpo DR4 suprimiu o TRIAL, induzindo a migração de monócitos (WEI et al., 2010). Também foi observada uma significativa expressão do receptor DR4 em células do melanoma, além de desempenhar função principal para a sensibilidade do TRIAL nas células da derme (KURBANOV et al., 2005). Nossos resultados mostraram uma alta expressão do TNFDR4 no grupo I em comparação com o grupo II e com o grupo III. O receptor VEGF é um dos mais potentes reguladores fisiológicos e patológicos da angiogênese (LI et al., 2012). Além disso, foi descrita uma alta expressão de VEGF nas células da papila dermal, sugerindo que estas células são responsáveis por processos angiogênicos no folículo piloso (KOZLOWSKA et al., 1998). Em nosso estudo, o VGFR2 teve uma alta expressão no grupo I.

Para as análises de fluorescência em nosso estudo, utilizamos células do folículo piloso de fetos caninos após expansão na segunda passagem, e marcadores superficiais como o Nanog e OCT3/4. Em um estudo para se obterem células-tronco induzidas pluripotentes de células do folículo piloso, foi observado que as células pluripotentes induzidas expressaram Nanog na fluorescência (WANG et al., 2013).

Um estudo mais recente, conduzido para se investigar a função do VEGFR2 na proliferação, adesão e migração de células cultivadas da bainha externa do pelo humano do epitélio central do folículo piloso, demonstrou-se, pela imunofluorescência dupla coloração, que o VEGFR2 era expresso em células positivas coradas com as citoqueratinas K15 e K19 (WU et al., 2014). Em nosso estudo não utilizamos coloração dupla e utilizamos o folículo piloso inteiro. Para se desenvolver um novo método de cultura e caracterização de melanócitos da bainha externa do pelo (ORSM), foi observado, após a segunda passagem, expressão moderada a alta do marcador hematopoiético c-Kit (CD117) no ORSM (GYNA et al., 2006). Ao utilizarmos células do folículo piloso, observamos uma baixa expressão do marcador CD117 na fluorescência e, na citometria de fluxo, após a segunda passagem, observamos uma baixa expressão deste marcador nas células do grupo I comparado com os demais grupos. Para a produção de novos folículos pilosos, os pelos passam por um ciclo de crescimento completo, envolvendo a fase anágena, a fase de regressão ou catagênica e uma fase de descanso ou telogênica. Nas duas últimas fases citadas, os folículos pilosos se reorganizam e preparam suas células-tronco para recomeçar o processo do ciclo do pelo (ALONSO; FUCHS, 2006). A expressão do crescimento e do ciclo do pelo depende dos marcadores S100A4 e S100A6. Em outro estudo, foi observado que em regiões do saco epitelial dos folículos pilosos de camundongos, o S100A4 foi confinado à região do *bulge* durante as três fases do ciclo de crescimento do pelo, enquanto o S100A6 foi encontrado no saco epitelial durante a fase anagênica (ITO; KIZAWA, 2001). Em nosso trabalho, realizamos a imunohistoquímica com o marcador S100 A1 para identificar em que fase do ciclo de crescimento do pelo as células do folículo piloso de fetos caninos se encontravam, em todos os grupos analisados. Nossos resultados demonstraram que o marcador S100A1 apresentou uma expressão mais acentuada nas células do grupo III do que no grupo I e no grupo II, os quais demonstraram uma discreta expressão.

O marcador S100 é conhecido por seu uso em marcações de células de Schwan e axônios (KAWABUCHI et al., 2001; HIRATA et al., 2003) e também por seu uso em diagnósticos de tumores dermais e identificação de melanócitos dendríticos (SOLER et al., 2007; JANI et al., 2008). Para analisar os padrões de distribuição dos elementos de imunoreatividade do S100 na pálpebra

superior de ovelhas, foi observado que os folículos pilosos junto com a bainha interna da raiz do pelo, positiva para S100, estava distribuída no tecido conectivo da pálpebra e em finas fibras nervosas ao redor da base da membrana desses folículos (AISA et al., 2004). Nossos resultados demonstraram células positivas distribuídas, não apenas na bainha interna do pelo, mas também em alguns pontos do bulbo piloso, a maioria na bainha da raiz externa do pelo. Ao estudar a migração dos melanoblastos no desenvolvimento do folículo piloso em camundongos (estágios 0-4 da morfogênese do folículo piloso) um aspecto curioso observado foi que a imunoreatividade (IR) nas células S100-IR diminui em contato com a membrana basal, indicando que neste estágio a morfogênese das células S100 IR foi menor do que as células CD117 c-Kit IR (PETERS et al., 2002). Observamos um padrão da expressão do S100 do grupo mais jovem para o grupo mais velho. No grupo I observamos a expressão do S100 na papila dermal, e no grupo II a expressão foi no bulbo piloso. No grupo III a expressão estava localizada na bainha externa do pelo. Em sua maioria, a expressão do S100 está próxima à membrana basal (Figura 4). Janet al. (2014) observaram células S100 positivas estão distribuídas na periferia de glândulas sebáceas de amostras de pele e folículo piloso de *scalps* humanos em 63% das amostras analisadas (JANG et al., 2014). Células S100 positivas, em nosso estudo estão distribuídas na região do bulbo piloso no grupo I e II. Nas células do grupo III, ocorreu a expressão em todas as regiões do folículo piloso, mas em algumas regiões, como, por exemplo, na bainha externa do pelo, a expressão aparentou ser mais alta do que nas outras regiões do folículo piloso.

A análise de PCR foi utilizada para avaliar a estrutura histológica da pele canina e caracterizar a resposta imune às lesões crônicas da dermatite atópica canina, comparadas com lesões não atópicas na pele de cães (THEERAWATANASIRIKUL et al., 2012; SCHLOTTER et al., 2011). Na análise do PCR de células dos tecidos do folículo piloso nós observamos que a expressão do S100 foi mais alta também nas células do grupo III do que nos outros grupos. Em estudo para se investigar a multipotência das células-tronco do folículo piloso, foi realizado o PCR com uma massa de queratinócitos cultivados, para se caracterizar essas células com o S100A4 e S100A6. Os resultados mostraram a expressão destes marcadores em todas as amostras, demonstrando que esses queratinócitos isolados eram células- tronco clonogênicas com alta capacidade proliferativa (AMICI

et al., 2009). Em nosso estudo observamos a presença do S100A4 nos tecidos dos folículos pilosos em todos os grupos de fetos analisados. A distribuição do S100A7 em folículos pilosos de *scalps* humanos foi demonstrado que o S100A7 era expresso, na sua maioria, nos queratinócitos da parte intermediária e distal da bainha externa do pelo (REITHMAYER et al., 2009). Não observamos este aspecto em nosso estudo, talvez porque o nosso foco foi a expressão do S100 em cada grupo (qual grupo expressava mais o marcador).

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter células tronco do folículo piloso de vibrissas de fetos caninos. A pluripotência das células-tronco do folículo piloso de fetos caninos, foi baseada na expressão dos marcadores OCT3/4, Nanog, CD105, CD90, SSEA4 e STRO-1 em todas as culturas celulares de diferentes idades gestacionais. O marcador S100 também foi observado em todos os grupos analisados, mas, no grupo III a expressão foi maior do que nos outros dois grupos, talvez por este grupo ter estruturas mais completas e menos precursores celulares, com diferentes graus de diferenciação e maturação.

REFERÊNCIAS

- AISA, J.; LAHOZ, M.; SERRANO, P.; PÉREZ-CASTEJON, M. C. ; JUNQUERA, C. ; MARTÍNEZ-CIRIANO, M. C.; PES, N.; VERA-GIL, A. S-100 protein immunoreactivity in the upper eyelid of the sheep *Ovis aries*. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, p. 457-462, 2004.
- ALONSO, L.; FUCHS, E. The hair follicle cycle. **Journal of Cell Science**, v. 11, n. 9, p. 391-393, 2006.
- AMBLER, C. A.; MÄÄTTÄ, A. Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 206-216, 2009.
- AMICI, A. W.; YAMATO, M. ; OKANO, T.; KOBAYASHI, K. The multipotency of adult vibrissa follicle stem cells. **Differentiation**, v. 77, p. 317-323, 2009.
- BLANPAIN, C.; LOWRY, W. E.; GEOGHEAN, A.; POLAK, L.; FUCHS, E. Self renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**, v. 118, p. 635-648, 2004.
- BRACHELENTE, C. ; PORCELLATO, I. ; SFORNA, M. ; LEPRI, E. ; MECHELLI, L. ; BONGIOVANNI, L. The contribution of stem cells to epidermal and hair follicle tumours in the dog. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 188-195, 2013.
- CARLYE, J. T.; DUNCAN, R. H.; NORVAL, K. W. **Patologia veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2000. p. 831-835.
- CHUNMENG, S.; TIANMIN, C. Skin a promising reservoir for adult stem cell populations. **Medical Hypothesis**, v. 62, p. 683-688, 2004.
- DREWA, T.; JOACHIMIAK, R.; KAZNICA, A.; SARAFIAN, V.; SIR, J. Primary cultures from rat vibrissae as a potential cell source for *in vitro* construction of urinary bladder wall grafts. **Transplantation Proceedings**, v. 41, p. 1932-1935, 2009.
- DYCE, K.M. ; SACK, M.; WESING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010. p. 243-245.
- EHAMA, R. ; ISHIMATSU-TSUJI, Y. ; IRIYAMA, S. ; IDETA, R. ; SOMA, T. ; YANO, K. ; KAWASAKI, C. ; SUZUKI, S. ; SHIRAKATA, Y. ; HASHIMOTO, K. ; KISHIMOTO, J. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 2106-2115, 2007.
- EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993.

GHO, C. G.; BRAUN, J. E. F.; TILLI, C. M. L. J.; NEUMAN, H. A. M.; RAMAEKERS, F. C. S. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture. **British Journal of Dermatology**, v. 150, p. 860-868, 2004.

GILLIAM, A. C.; KREMER, B. I.; YOSHIDA, Y.; STEVENS, R. S.; TOOTEL, E.; MARCELL, B. M.; HAMMERBERG, C.; KOOPER, D. K. The human hair follicle: a reservoir of CD40 B7 deficient of Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 4, p. 422-427, 1998.

G.Y,NA.; PAEK, S. H.; PARK, B. C.; KIM, D. W.; LEE, W. J.; LEE, S. J.; KIM, M. K.; KIM, J. C. Isolation and characterization of outer root sheath melanocytes of human hair follicles. **British Journal of Dermatology**, v. 155, p. 902-909, 2006.

HANSON, S. E.; BENTZ, M. L.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. **American Society of Plastic Surgeons**, v. 125, n. 2, p. 510-516, 2010.

HILL, R. P.; GLENDHILL, K.; GARDNER, A.; HIGGINS, C. A. ; CRAWFORD, H. ; CLIFFORD, L. ; HUTCHISON, C. J. ; OWENS, W. A. ; KARA, B. ; ELIZABETH JAMES, S. ; JAHODA, C. A. B. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. **Ploes One**, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.

HIRATA, K. ; HE, J. ; HIRAKAWA, Y. ; LIU, W. ; WANG, S. ; KAWABUCHI, M. HSP27 is markedly induced in Schwann cells columns and associated regenerating axons. **Glia**, v. 42, p. 1-11, 2003.

HOFFMAN, R.; EICHELER, W.; WENZEL, E.; HAPPLE, R. Interleukin-1 β - induced inhibition of hair growth in vitro is mediated by cyclic AMP. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 1, p. 40-44, 1997.

HOOGDUJIN, M. J. ; GORJUP, E. ; GENEVER, P. G. Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, p. 49-60, 2006.

INAMATSU, M. ; TOCHIO, T. ; MAKABE, A. Embryonic dermal condensation and adult dermal papilla induce hair follicles in adult glabrous epidermis through different mechanisms. **Development, Growth Differentiation**, v. 48, p. 73-86, 2006.

ITO, M.; KIZAWA, K. Expression of calcium- binding S100 proteins A4 and A6 in regions of the epithelial sac associated with the onset of hair follicle regeneration. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 116, n. 6, p. 956-963, 2001.

JANG, Y. H. ; KIM, L. S. ; LEE, J. S. ; KNOWN, K-Y. ; LEE, S-J. ; KIM, W. D. ; LEE, W. J. Possible existence of melanocytes or melanoblastsin human sebaceous glands. **Annals of Dermatology**,v. 26,n. 4, p. 469-473, 2014.

- JANI, P. ; CHETTY, R. ; GHAZARIAN, D. M. An unusual composite pilomatrix carcinoma with intralesional melanocytes: differential diagnosis, immunohistochemical evaluation, and review of the literature. **American Journal of Dermatopathology**, v. 30, p. 174-177, 2008.
- JIANG, S. ; ZHAO, L. ;PURANDARE, B. ; HANTASH, B. M. Differential expression of stem cells markers in human follicular bulge and interfollicular epidermal compartments. **Histochemistry, Cell, Biology**, v. 133, p. 455-465, 2010.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. p. 243-245.
- JWANG, F.; DODD, C.; SHANKOWSKY, A. H.; SCOTT, G. P.; TREDGET, E. Deep dermal fibroblast contribute hypertrophic scarring. **Laboratory Investigation**, v. 88, p. 1278-1290, 2008.
- KAWABUCHI, M. ; ZHOU, C. J. ; WANG, S. ; NAKAMURA, K. ; LIU, W. T. ; HIRATA, K. The spatiotemporal relationship among Schwann cells, axons and postsynaptic acetylcholine receptor regions during muscle reinnervation in aged rats. **The Anatomical Record**, v. 264, p. 183- 202, 2001.
- KLOEPPER, J. E. ; TIEDE, S. ; BRINCKMANN, J. ; REINHARDT, D. P. ; MEYER, W. ; FAESSLER, R. ; PAUS, R. Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. **Experimental Dermatology**, v.17,p.502-609, 2008.
- KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, A.; NISHIFUJI, K.; AMAGAI, M.; IWASAKI, T.; OHYAMA, M. Canine hair follicle keratinocytes enriched with bulge cells have the highly proliferative characteristic of stem cells. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 338-346, 2009.
- KOZLOWSKA, U.; BLUME-PEYTAVI, U.; KODELJA, V. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in various compartments of the human hair follicle. **ArchivesDermatology Res**, v. 290, p. 661-668, 1998.
- LARROUSE, P. M. **Larrouse dos cães**. 3. ed. São Paulo: Editora Larrouse do Brasil, 2005. 384 p.
- LAKO, M.; ARMSTRONG, L.; CAIRNS, M. P.; HARRIS, S.; HOLE, N.; JAHODA, C. A. B. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haemotopoietic system. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3967-3974, 2002.
- LEI, M.; BAI, X.; YANG, T.; LAI, X.; QUIU, W.; YANG, L.; LIAN, X. Gsdma3 is a new factor needed for TNF- α mediated apoptosis signal pathway in mouse skin keratinocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 138, n. 3, p. 385-396, 2012.
- LI, W. ; Z- F. ; MAN, Y. X. ; LI, CHU-MING. ; ZHOU, J. ; CHEN, Q-J. ; YANG. H. X. ; WU, J-X. ; CAI, S-Q. ; ZHENG, M. VGF up regulates VGF receptors-2 on human outer root sheath cells and stimulates proliferation through ERK pathway. **Molecular Biology Reproduction**, v. 39,p. 8687-8694, 2012.

MASCIA, F. ; MARIANI, V. ; GIROLOMONI, G.; PASTORE, S. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced Skin Inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 1, p. 303-312, 2003

MERCATI, F. ; PASCUCCHI, P. ; CECARELLI, P. ; DALL'ANGELIO, C. ; PEDINI, V. ; GARGIULIO, M. A. Expression of mesenchymal stem cell marker CD90 on dermal sheath cells of the anagen hair follicle in canine species. **European Journal of Histochemistry**, v. 53, n. 3, p. 159-166, 2009.

MORRIS, R. J.; LIU, Y.; MARLES, L.; YANG, Z.; TREMPUS, C.; LI, S.; LIN, J.S.; SAWICKI, J. A.; COTSARELIS, G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 4, 411-417, 2004.b

NAKAMURA, Y.; MUGURAMA, Y.; YAHATA, T.; MIYATAKE, H.; SAKAI, D.; MOCHIDA, J; HOTTA, T.; ANDO, K. Expression of CD90 on keratinocytes stem/progenitor cells. **British Journal of Dermatology**, v. 154, p. 1062-1070, 2006.

NAKAO, K.; MORITA, R.; SAJI, Y.; ISHIDA, K.; TOMITA, Y.; OGAWA, M. The development of a bioengineered organ germ method. **Nature Methods**, v. 4, p. 227-230, 2007.

OMRAN, O. M.; ATA, H. S. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors DR4 and DR5 in human non melanoma skin cancer. **American Journal of Dermatopathology**, v. 36, p. 710-717, 2014.

OSADA, A.; IWABUCHI, T.; KISHIMOTO, J.; HAMAZAKI, T. S.; OKOCHI, H. Long-term of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 5, p. 975-982, 2007.

OSADA, A.; KOBAYASHI, K.; MASUI, S.; HAMAZAKI, T. S.; OKOCHI, H.; YASUDA, K. Cloned cells from the murine dermal papilla have hair-inducing ability. **Journal of Dermatological Science**, v. 54, p. 129-131, 2009.

OHYAMA, M.; TERUNUMA, A.; TOCK, C. L.; RADONOVICH, M. F. ; PISSE-MAISSON, C.A. ; HOPPING, S.B. ; BRADY, J.N. ; UDEY, M.C. ; VOGEL, M.C. Characterization and Isolation of stem- cell enriched human hair follicle bulge cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1249- 1260, 2006

PASCUCCHI, L.; MERCATI, F.; GARGIULIO, A. M.; PEDINI, V.; SORBOLINI, S.; CECARELLI, P. CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmic region of canine hair follicles. **European Society of Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 244-251, 2006.

PETERS, E. M. J.; TOBIN, D. J.; BOTCKAREVA, N.; MAURER, M.; PAUS, R. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-kit expression. **The Journal of Histochemistry e Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 751-766, 2002.

PHILPOTT, M. P.; SANDERS, D. A.; BOWEN, J.; KEALY, T. Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth *in vitro*: a possible role for interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in alopecia areata. **British Journal of Dermatology**, v. 135, p.942-948, 1996.

RAPOSIO, E. ; GUIDA, C. ; BALDELLI, I. ; CURTO, M. ; FIOCCA, R. ; KUNKUL, A. ; ROBELLO, G. ; SANTI, P. L. Characterization of multipotent cells from human adult hair follicles. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 320- 323, 2007.

REITHMAYER, K. ; MEYER, K. C. ; KLEDITZSCH, P. ; TIEDE, S. ; UPPALAPATI, S. K. ; GLÄSER, HARDER, J. ; SCHRÖDER, J. M.; PAUS, R. Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defencesystem that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. **British Journal of Dermatology**, v. 161, p. 78-89, 2009.

REYNOLDS, A. J. ; JAHODA, C. A. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. **Differentiation**, v. 72, p. 566-575, 2004.
RIEKISTINA, U.; MUCENIECE, R.; CAKISTINA, I.; MUIZNIEKS, I.; ANCANS, J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. **Cytotechnology**, v.58, p.153-162, 2008.

RIEKISTINA, U.; CAKISTINA, I.; PARFEJEVS, V.; HOODUIJN, M.; JANKOVISKIS, G.; MUIZNIEKS, I.; MUCENIECE, R.; ANCANS, J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. **Stem Cell Review and Reproduction**, v. 5, p. 378-386, 2009.

SAMUELSON, D. A. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2007. p. 281-284.

SCHLOTTER, Y.; RUTTEN, V .P. M. G.; RIEMERS, F. M.; KNOL, E. F.; WILLEMSE, T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, p. 20-26, 2011.

SELLHEYER, K. ; NELSON, P. The ventral proximal nail fold: stem cell niche of the nail and equivalent to the follicular bulge – a study on developing human skin. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 39, p. 835-843, 2012.

SHI, C.; MAI, Y.; CHENG, T. Identification of cell populations from the dermal papillae of human hair follicle. **Transplantation Proceedings**, v. 36, p. 3208-3211, 2004.

SOLER, A. P. ; BURCHETTE, J. L. ; BELLET, J. S. ; OLSON JR, J.A. Cell adhesion protein expression in melanocytic matricoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 34, p. 456-460, 2006.

SUTER, M. M.; PANTANO, M. D.; FLANDERS, J. A. ; AUGUSTIN-VOSS, G.H.; DOUGHTERTY, P. E.; VARVAYANIS, M. Comparison of growth and differentiation of normal and neoplastic canine keratinocyte culture. **Veterinary Pathology**, v. 28, p.131-138, 1991.

THEERAWTANASIRIKUL, S.; SURIYAPHOL, G.; THANAWONGNUWECH, R.; SAILASUTA, A. Histologic morphology and involucrin, filaggrin, and keratin expression in normal canine skin from dogs of different breeds and coat types. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p.163-170, 2012.

TANG, L.; NAN, LI; XIE, H.; JIN, Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, p. 832-842, 2011.

TREMPUS, C. S.; MORRIS, R. J.; BORTNER, C. D.; COTSARELIS, G.; FAIRCLHOTE, R. S.; REECE, J. M.; TENNANT, R. W. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD 34. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 120, p. 501-511, 2003.

WANG, Y.; LIU, J.; TAN, X.; LI, G.; GAO, Y.; LIU, X.; ZHANG, L.; LI, Y. Induced pluripotent stem cells from human hair follicle mesenchymal stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2013.

WU, X. J.; WEI, J. Z.; JING, J.; DAN, X.; HAI, L.; MIN, Z.; ZHONG, F. A. L. VEGF165 modulates proliferation, adhesion, migration and differentiation of cultured human outer root sheath cells from central hair follicle epithelium through VEGFR-2 activation in vitro. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, p. 152-160, 2014.

YOO, B. Y.; SHIN, Y. H. ; YOON, H-H.; SEO, K. Y.; PARK, J. K. Hair follicular cell/organ culture in tissue engineering and regenerative medicine. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 323-331, 2010.

ZHANG, S. ; HU, H. ; ZHANG, H. ; LIU, S. ; ZHANG, Y. ; LEI, X. ; NING, L. ; CAO, Y.; DUAN, E. Hair follicle stem cells derived from single rat vibrissa via organ culture reconstitute hair follicle in vivo. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 1075-1085, 2012.