

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PADRONIZAÇÃO DA CULTURA DE QUERATINÓCITOS
LAMELARES DE CASCO EQUINO**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Botucatu, São Paulo

Maio de 2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**PADRONIZAÇÃO DA CULTURA DE QUERATINÓCITOS
LAMELARES DE CASCO EQUINO**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Elenice Deffune

Botucatu, São Paulo

Maio de 2017.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pfeifer, João Pedro Hübbe.

Padronização da cultura de queratinócitos lamelares de casco equino / João Pedro Hübbe Pfeifer. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 50501013

1. Equino - Doenças. 2. Casco de animais. 3. Laminite.
4. Queratinócitos. 5. Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Casco; Equinos; Estojo córneo; Laminite; Queratinócitos.

Autor: João Pedro Hübbe Pfeifer

Data: 29 de maio de 2017.

Composição da Banca Examinadora

Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente/Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ, UNESP, Botucatu

Profº Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ, UNESP, Botucatu

Dr. Leandro Maia

Membro

Secretaria de Saúde - Vigilância Sanitária
Prefeitura Municipal de Botucatu/SP

Agradecimentos

À Deus, agradeço pelas oportunidades que sempre tive durante o curso, mas principalmente a possibilidade de lapidar meu conhecimento e ao mesmo tempo desenvolver a ciência para novas terapias visando a saúde animal.

Agradeço à Prof^a Dra Ana Liz Garcia Alves por ter me aceito como orientado, acreditado em nosso projeto, os sábios conselhos e palavras de incentivo nos momentos difíceis, sou grato por sua orientação. Aprendi muito com seus conhecimentos em terapias regenerativas e engenharia de tecidos.

À minha co-orientadora Prof^a Dra Elenice Deffune, que muito contribuiu para execução deste experimento com seu vasto conhecimento em engenharia de tecidos e cultura celular.

Aos colegas de pós-graduação e a nossa equipe do Laboratório de Terapia Regenerativa, FMVZ - UNESP, por termos um ótimo convívio e sempre nos ajudarmos.

Aos meus pais, Maria da Graça e Luiz Fernando por acreditarem no meu trabalho, pelo amor e o apoio incondicional, suportando a distância e o pouco convívio que tivemos nesse período.

À Marina, minha companheira que sempre esteve ao meu lado de braços abertos em todos os momentos.

À CAPES por ter concedido a bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1	10
1.1. Introdução e Justificativa	10
1.2. Revisão de Literatura	12
1.2.1. Contextualização Temática Laminite	12
1.2.2. Cultivo de Queratinócitos	15
1.3. Referências	21
CAPÍTULO 2	28
2.1. Artigo Científico	28
Resumo	29
Abstract	30
1. Introdução	31
2. Material e Métodos	32
2.1. Coleta de Tecido Laminar	32
2.2. Isolamento de Queratinócitos	33
2.3. Cultivo de Queratinócitos	34
2.4. Imunofluorescência Cultivo Celular	35
2.5. Imunofluorescência de Explantes Lamelares	36
3. Resultados	37
4. Discussão	38
5. Conclusão	42
6. Referências	43
3. Considerações Finais	51
3.1. Dificuldades Encontradas	51

PFEIFER, J. P. H. **Padronização da Cultura de Queratinócitos Lamelares de Casco Equino**. Botucatu, 2017. Dissertação de Mestrado. 51 Pág. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os queratinócitos são células presentes na epiderme, constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Estas células organizam-se em camadas de diferentes estágios de maturação celular (camada basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea) e tem a função de revestimento desses tecidos. Diversos estudos buscam elucidar e caracterizar tecidos hígidos de origem epitelial, como pele, olhos e casco, para que possam identificar os mecanismos de desenvolvimento de enfermidades nesses tecidos. O casco equino é formado por epiderme em diferentes estágios de queratinização, subdivididos em estrato externo ou parede do casco, estrato médio e estrato interno, nesse último estão localizadas as lâminas epidermais primárias (LEP) e secundárias (LES) onde os queratinócitos estão presentes junto a membrana basal (transição de epiderme e derme, junção que faz a adesão do casco com a falange distal). É notória a importância do casco na saúde dos equinos, mas o conhecimento em nível celular é pouco entendido. Estudos envolvendo o cultivo de queratinócitos equinos são escassos. Sabe-se que o desenvolvimento de cultivos de queratinócitos *in vitro* é uma condição para estudos sobre a biologia molecular, crescimento e diferenciação celular. Alguns métodos já estão estabelecidos, como para cultivo de queratinócitos de pele, mas poucas metodologias são encontradas para queratinócitos lamelares. O objetivo desse estudo, foi padronizar o cultivo de queratinócitos provenientes de casco equino, visando futuramente associar ao estudo da medicina regenerativa para assim estabelecer um modelo experimental *in vitro* e indicar o uso criterioso de terapias regenerativas para a laminite equina. Desta forma, foi realizado o cultivo em monocamada e caracterização de queratinócitos lamelares. Para isso, o método de cultivo primário utilizado foi através de explantes obtidos de três regiões do casco (dorso-medial, dorsal e dorso-lateral). As células foram caracterizadas para os marcadores anti pan-

cytokeratin (AE1/AE3), vimentin (V9), p63 (4A4) e Ki-67 (MIB-1) nos cultivos e nos explantes. As células foram cultivadas até terceira passagem, tendo marcação positiva para pan-CK, p63 e Ki-67 e fraca marcação para vimentina. Já as lâminas epidermais não tiveram marcação de vimentin e Ki-67, porém marcaram acentuadamente para pan-CK e p63. Este estudo demonstrou a exequibilidade do uso de explantes lamelares do casco de equinos, como forma de isolamento de queratinócitos em cultivos primários, bem como caracterizou a habilidade de proliferação desses queratinócitos em monocamada.

Palavras-chave: Casco, Cultivo Celular, Equinos, Estojo Córneo, Laminite, Queratinócitos.

PFEIFER, J. P. H. **Culture Standardization of Equine Hoof Lamellae Keratinocytes**. Botucatu, 2017. Master's Dissertation. Pages 51. School of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract

The keratinocytes are cells presented in the epidermis, constituted by the stratified keratinized squamous epithelium. These cells organized in layers of different stages of cell maturation (basal or germinative, prickly, granular, lucid and corneal layers) and have a tissue coating function. Several studies seek to elucidate and characterize healthy tissues of epithelial origin, such as skin, eyes and hoof, so that they can identify the mechanisms of development of diseases in these tissues. The equine hoof is composed of epidermis at different stages of keratinization, subdivided into external stratum, middle stratum and internal stratum, in which the primary epidermal lamellae (PEL) and secondary epidermal (SEL) are located and where keratinocytes are present along the basement membrane (Transition of the epidermis and dermis, which joins the hoof to the distal phalanx). It is evident the importance of the hoof health of horses, but the knowledge at the cellular level is poorly understood. Studies involving the culture of equine keratinocytes are scarce. The development of keratinocyte cultures in vitro is a condition for studies on molecular biology, cell growth and differentiation. Some methods are already established, such as for culture of skin keratinocytes, but few methodologies are found for lamellar keratinocytes. The aim of this study was to standardize the cultivation of keratinocytes from equine hoof, aiming future associate with the study of regenerative medicine so as to establish an experimental in vitro model and indicate the wise use of regenerative therapies for equine laminitis. In this way, monolayer culture and characterization of lamellar keratinocytes were performed. For this, the method of primary culture used was through explants obtained from three regions of the hoof (dorso-medial, dorsal and dorso-lateral). Cells were characterized for anti pan-cytokeratin (AE1 / AE3), vimentin (V9), p63 (4A4) and Ki-67 (MIB-1) markers in cultures and explants. Cells were grown to third passage, having positive marking for pan-CK, p63 and Ki-67 and

poor labeling for vimentin. Already the epidermal laminae were not labeling for vimentin and Ki-67, but pan-CK and p63 had sharp labeling. This study demonstrated the feasibility of using lamellar explants in equine hoofs as a form of isolating keratinocytes in primary cultures, as well as characterizing the proliferation ability of these keratinocytes in monolayers.

Keywords: Case corneum, Cell Culture, Equine, Hoof, Keratinocytes, Laminitis.

Capítulo 1:

1.1. Introdução e Justificativa

Diversas enfermidades relacionadas com distúrbios epidermais ou tecidos adjacentes, são foco de pesquisas e experimentação tanto em medicina humana, quanto na medicina veterinária. Doenças primárias ou secundárias na pele, folículos pilosos, glândulas e casco, são alvo desses trabalhos.

Os equinos, espécie ungulada, possuem casco, também chamado de estojo córneo, na extremidade de seus membros. O estojo córneo é um órgão pertencente ao sistema tegumentar, constituído por epiderme e derme, tendo a função de revestir, dar proteção à terceira falange, e principalmente, sustentar e equilibrar as pressões que o peso do cavalo exercem em sua biomecânica.

Algumas enfermidades atingem o casco e podem ser primárias ou secundárias a outras disfunções no organismo como ocorre na pele ou outros anexos. As mais comuns são de origem tendínea, ligamentar, óssea/articular, infecciosa, traumas e fraturas, e principalmente a laminite (POLLITT, 1995). Os mecanismos que envolvem a laminite, sejam em sua etiopatogenia ou histopatologia, divergem opiniões (EKFALCK *et al.*, 1988; HEYMERING, 2010).

Obel (1948), descreveu alterações histopatológicas na região lamelar do casco, em derme e epiderme, e relatou que quando a matriz do casco não está envolvida, as alterações restringem-se à epiderme. Essas alterações podem estar relacionadas com o conceito de que a laminite é um distúrbio metabólico primário da epiderme do casco, conduzindo à inibição da diferenciação de queratinócitos (OBEL, 1948; LARSSON; OBEL; ÅBERG, 1956; EKFALCK *et al.* 1988), assim como a alteração do citoesqueleto do queratinócitos (KELLY *et al.*, 1991; NOURIAN *et al.*, 2007).

Uma maneira de avaliar o impacto dessa enfermidade é realizando o cultivo de queratinócitos presentes nas lâminas epidermais do casco, para que se possa entender esses processos biológicos.

A ampliação do conhecimento da biologia celular do que ocorre na laminite, é de suma importância e para tal, é necessário, que pesquisadores investiguem essas respostas executando experimentos que atinjam esses objetivos.

O estudo dos queratinócitos do casco equino é fundamental para que sejam entendidas suas funções, seus mecanismos de diferenciação e como atuam no processo da laminite. A ação terapêutica junto a essas células, na possível utilização de cultivo de queratinócitos isolados de equinos acometidos por laminite em co-cultura com células tronco mesenquimais, pode avaliar a ação imunomoduladora e anti-inflamatória da mesma.

O cultivo de queratinócitos já foi realizada experimentalmente por diferentes pesquisadores. No entanto, existem diferenças em sua descrição de acordo com sua origem, formas de obtenção das células, diferentes metodologias de cultivos e meios de cultivo.

O processo de cultivo de queratinócitos merece atenção quanto ao seu procedimento operacional padrão (POP), por se tratar de um tipo celular com exigências diferentes das comumente cultivadas (EKCFALCK; RODRIGUEZ-MARTINEZ; OBEL, 1990; WUNN *et al.*, 1999; DAHM *et al.*, 2002; VISSER; POLLITT, 2010; SHARMA *et al.*, 2013). A elaboração de um protocolo efetivo para isolamento, crescimento, proliferação, viabilidade e caracterização celular demanda uma grande diversidade de testes para que a caracterização inequívoca dos mesmos seja alcançada.

A padronização de uma técnica de cultivo celular é importante para que seja possível executar a denominada medicina veterinária translacional, otimizando o sucesso dos ensaios em laboratório em protocolos clínicos de terapia celular, desenvolvendo desta forma, novos tratamentos para enfermidades que acometem os equinos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar o cultivo de queratinócitos provenientes de casco equino, visando futuramente associar ao estudo da medicina regenerativa para assim estabelecer um modelo experimental *in vitro* e indicar o uso criterioso de terapias regenerativas para a laminite equina.

1.2. Revisão de Literatura

1.2.1. Contextualização Temática

A laminite é uma enfermidade grave que atinge os equinos, sendo considerada uma doença vascular que evolui para o desprendimento das lâminas dérmicas e epidérmicas do casco. Ocorrem alterações da circulação digital seguido por reação hiperêmica e lesões de reperfusão (HOOD *et al.*, 1993).

Existem diversas hipóteses para explicar a fisiopatologia da laminite. Trata-se de uma doença geralmente secundária a outros distúrbios do organismo equino, tais como: síndromes cólicas, miosites, retenção de placenta, entre outras enfermidades que tenham por consequência o desequilíbrio vascular, tóxico/metabólico, enzimático e inflamatório (HEYMERING, 2010).

Existem alguns distúrbios sistêmicos que levam à laminite dos equinos, que há similaridade na sua patofisiologia com humanos, como nos casos de endotoxemias gerados por distúrbios gastrointestinais. Nestes casos há desequilíbrio vascular, alteração da microbiota e absorção de toxinas, que ocasionam inflamação sistêmica e desencadeiam inflamação local nos órgãos-alvo (rins, pulmões, fígado), geralmente causando lesões secundárias com danos às células desses órgãos por infiltração leucocitária, predominantemente neutrófilos (BROWN *et al.*, 2006).

Em equinos, nos casos de endotoxemias, as regiões alvo frequentemente afetadas são as interfaces dermo-epidérmicas em nível das lâminas secundárias causando a laminite (BELKNAP *et al.*, 2007; FRENCH; POLLITT, 2004). A partir do processo inflamatório sistêmico, um complexo de moléculas endógenas é ativado (FALEIROS; NUOVO; BELKNAP, 2009). Essas moléculas denominadas padrão molecular associado ao dano (DAMPs), são sinalizadoras em lesões nos tecidos e células. Neste grupo também estão presentes outras moléculas chamadas padrão molecular de reconhecimento de patógeno (PAMPs), em lesões sépticas, e um subgrupo de fatores pró-inflamatórios associado a imunidade inata, chamado de alarminas (BIANCHI, 2007).

No grupo das alarminas há um complexo de proteínas diméricas denominado Calprotectina (CP), cujos estudos relacionados com a laminite dos

equinos são recentes. A CP tem possível atuação na indução da lesão inflamatória, tendo uma ligação direta na fisiopatologia dessa doença na fase de incapacidade de adesão das lâminas do casco (FALEIROS; NUOVO; BELKNAP, 2009).

Na medicina humana o estudo da CP e seus subtipos estão bem difundidos (CHOI *et al.*, 2015). Sabe-se que desse complexo proteico derivam dois subtipos, S100A8 e S100A9, também chamados de MRP8 e MRP14 respectivamente (VOGL *et al.*, 2007).

Entre várias funções já descritas na literatura, os subtipos proteicos S100A8 e S100A9 são quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, ativadores de integrinas dos neutrófilos, inibidores da síntese de imunoglobulinas e indutores de apoptose em diferentes tipos celulares (PASSEY *et al.*, 1999). Induzem também a expressão de genes de citocinas em queratinócitos em cultura (NUKUI *et al.*, 2008), a morte celular mediada por mitocôndrias que são decorrentes de alterações no potencial transmembrana das mitocôndrias em resposta a pontos gatilho, levando a produção de espécies reativas a oxigênio (ROS) ou permeabilização da membrana mitocondrial e conseqüentemente morte celular (GHAVAMI *et al.*, 2008) e promovem o choque induzido por endotoxina pela ativação de toll-like receptor 4 TLR-4 (VOGL *et al.*, 2007). Estão presentes em neutrófilos, monócitos ativados e macrófagos, onde são utilizadas como marcadores leucocitários, e são fatores importantes para amplificar o estado inflamatório dessas células (VAN LENT *et al.*, 2007; GROESH *et al.*, 2008).

No entanto, S100A8 e S100A9 submetem-se a uma regulação distinta em células epiteliais, incluindo queratinócitos (BENOIT *et al.*, 2006). Essas proteínas raramente são expressas em queratinócitos normais, mas sob estresse, expressam esses subtipos de CP, assim, além da sinalização apoptótica e inflamatória, causam alterações no seu citoesqueleto (KELLY; JONES; FLEMING, 1989; KELLY *et al.*, 1991). Nourian *et al.* (2007) demonstraram em laminite induzida por oligofrutose nos equinos, que um dos principais fatores de lesão laminar é a alteração do citoesqueleto de queratinócitos devido a diminuição de hemidesmossomos nas células epiteliais da lâmina basal, evidenciada no início da claudicação.

Outro dado interessante encontrado, é de que queratinócitos humanos quando em cultura e expostos a CP induzem a expressão de diversas citocinas e quimiocinas (NUKUI *et al.*, 2008). O subtipo S100A8 de CP é um quimio-atrativo potente para neutrófilos em ratos *in vitro* e *in vivo* (LACKMANN *et al.*, 1993; RICKMAN *et al.*, 2003). Os cultivos de queratinócitos, quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias, produzem os componentes proteicos S100A8 e S100A9 de uma forma dose dependente (NUKUI *et al.*, 2008).

A capacidade em regular esses fatores inflamatórios é um possível tratamento para laminite, no qual as células tronco mesenquimais, por meio de sua ação imunomoduladora, poderiam ser empregadas.

Atualmente essa terapia já é utilizada por veterinários, demonstrando resultados satisfatórios com relação ao estímulo de reparação e crescimento do estojo córneo, evidenciado pela melhora da qualidade tecidual. No entanto, há poucos relatos sobre o efeito dessa terapia na laminite e poucos são os estudos controlados (MORRISSON, 2011; DRYDEN *et al.*, 2013).

As células tronco mesenquimais (CTM) adultas vem sendo empregadas em tratamentos ortopédicos na medicina veterinária principalmente na espécie equina, e estão presentes na maioria dos tecidos em diferentes quantidades. As CTM podem ser isoladas de vários tecidos e fluídos do organismo, sendo as principais fontes a punção de medula óssea e a dissociação de tecido adiposo, pois possuem facilidade de coleta, viabilidade celular, centrifugação acessível, grande potencial de expansão e capacidade de diferenciação (WATTS, 2014; STEWART; STEWART, 2011).

Sabe-se que além do potencial de diferenciação celular do tecido lesado e o papel na regeneração ou reparação tecidual, as CTM possuem a capacidade de modular o microambiente da lesão afim de organizar a reparação tecidual, desempenhando um papel anti-inflamatório e imunomodulador, inativando ou inibindo a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e/ou estimulando a ativação de citocinas anti-inflamatórias (PERONI; BORJESSON, 2011). Esses são fatores determinantes que resultam em uma recuperação de melhor qualidade, mais rápida e com baixo índice de recidivas (RICHARDSON

et al., 2007). Assim as CTMs orquestram o *crosstalking* entre as diferentes células para desempenhar melhor suas as funções.

Os tratamentos para laminite têm como objetivo proporcionar melhor condição de vida ao animal, preconizando-se a analgesia e o casqueamento e ferrageamento corretivos (PARKS; O'GRADY, 2003). Assim, novos tratamentos que possibilitem minimizar e/ou reverter os efeitos causados por essa enfermidade devem ser pesquisados.

É interessante que novos estudos busquem entender e atenuar os mecanismos “iniciadores” para o desenvolvimento da laminite nos equinos, assim diminuiria consideravelmente os casos de fase clínica. A análise da ação dos subtipos de CP nos queratinócitos e a capacidade que as CTM possuem para inibir ou reduzir a ação desses subtipos proteicos pró-inflamatórios envolvidos nessa enfermidade são importantes.

A pesquisa *in vitro* de queratinócitos provenientes de equinos com laminite em co-cultura com CTMs, pode ser um caminho para o desenvolvimento de uma terapia regenerativa criteriosa. Para fundamentar estudos mais aprofundados, deve-se padronizar as etapas iniciais, como o cultivo de queratinócitos hígidos.

1.2.2. Cultivo de Queratinócitos

Diversos estudos buscam elucidar e caracterizar tecidos hígidos de origem epitelial, como pele, olhos e casco, para que possam identificar os mecanismos de desenvolvimento de enfermidades nesses tecidos (PARSA *et al.*, 1999; VISSER; POLLITT, 2010; CARTER *et al.*, 2010; CARTER *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2013; SHIMABUKURO *et al.*, 2014; LINARDI *et al.*, 2015).

Os queratinócitos são células presentes na epiderme - constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado - organizam-se em camadas de diferentes estágios de maturação celular (camada basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea) e tem a função de revestimento desses tecidos (MORAES, 2008).

O casco equino tem a função de proteger, dar sustentação e equilibrar as forças exercidas pela anatomia do animal. É formado por epiderme em diferentes estágios de queratinização, subdivididos em estrato externo ou

parede do casco, estrato médio e estrato interno, nesse último estão localizadas as lâminas epidermais primárias (LEP) e secundárias (LES) onde os queratinócitos estão presentes junto a membrana basal (transição de epiderme e derme, junção que faz a adesão do casco com a falange distal). A produção contínua de células da camada basal periférica empurra as células queratinizadas para lâmina primária, de modo que contribuem para a espessura e resistência das lâminas epidérmicas secundárias e primárias, devido a maturação celular que perde o núcleo e preenche seu citoplasma de filamentos de queratina durante a transição pelas subdivisões até a parede do casco (POLLITT, 1995).

Em média um casco hígido de animal adulto, apresenta em torno de 600 ou mais LEPs sendo que cada pode apresentar de 100 - 150 LESs (POLLITT, 1995). Uma análise *in vitro* da cultura de queratinócitos de casco equino, realizada por Dahm et al. (2002), demonstraram que essas células tem característica morfológica cubóide/ovalada de tamanho aproximado de 5 µm de comprimento e 15,6 µm de largura.

O cultivo de queratinócitos equinos é estudado há décadas, os trabalhos dividem-se em objetivos distintos, sejam eles na diversidade de tecidos para obtenção dos queratinócitos, formas de isolamento, meios de cultivo ou na avaliação dos mesmos e expressão de citoqueratinas (EKCFALCK; RODRIGUEZ-MARTINEZ; OBEL, 1990; WUNN *et al.*, 1999; DAHM *et al.*, 2002; VISSER; POLLITT, 2010; SHARMA *et al.*, 2013).

As fontes para obtenção de queratinócitos isolados de equinos variam entre os tecidos de pele e casco. Wunn *et al.* (1999) e Visser e Pollitt (2010) realizaram isolamento a partir desses dois tecidos, já Dahm *et al.* (2002) e Sharma *et al.* (2013) isolaram queratinócitos apenas de pele; Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel (1990) obtiveram queratinócitos isolados de casco.

O ponto chave de um cultivo de queratinócitos, está relacionado com a forma de isolamento dessas células, sendo que duas técnicas são mais utilizadas: a dissociação mecânica e a enzimática. O isolamento utilizando a técnica mecânica com explantes é a forma “natural” para isolamento das células de um tecido, uma vez que, não são utilizados agentes químicos,

porém, exige maior tempo, para um isolamento adequado (EKCFALCK; RODRIGUEZ-MARTINEZ; OBEL, 1990; SHARMA *et al.*, 2013).

A dissociação enzimática é a técnica mais clássica para isolamento celular, sendo necessária algumas horas para a digestão do tecido e isolamento das células pretendidas, mas não se sabe o quanto a ação de um agente bioquímico influencia na qualidade do isolado celular. Os trabalhos que utilizaram essa técnica, Wunn *et al.* (1999), Dahm *et al.* (2002) e Visser e Pollitt (2010), não demonstraram perda da viabilidade celular.

A elaboração de um meio de cultivo adequado é importante para dar suporte e obter proliferação e viabilidade celular apropriadas. A diferença substancial entre os principais meios de cultivo artificiais utilizados no cultivo de queratinócitos como Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Minimal Essential Medium (MEM), considerados como meio basal é que a formulação de DMEM contém cerca de 2-4 vezes mais vitaminas e sais minerais que o meio MEM (ARORA, 2013). Os meios por si só não são suficientes para garantir a proliferação de queratinócitos e portanto, recebem a suplementação como descrito no Quadro 1.

Autor	Meio de Cultura	SFB	EGF	EPB	Hidro-cortisona	Cálcio	Insulina	AA NE	β -Mercapto-etanol	Antibiótico + Antimicrobótico	L-glutamina
A	DMEM	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	✓	✓
B	DMEM	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓	-
C	WME	✓	✓		✓	✓	✓	-	-	-	-
D	DMEM no calcium	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-
E	MEM	✓	✓	✓	-	-	-	✓	✓	✓	-

QUADRO 1. Configuração dos meios de cultivo e suplementos utilizados por cada autor citado. A - Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel (1990); B - Wunn *et al.* (1999); C - Dahm *et al.* (2002); D - Visser e Pollitt (2010); E - Sharma *et al.* (2013). SFB - soro fetal bovino, EGF - fator de crescimento epidermal, EPB - extrato de pituitária bovina, AANE - aminoácido não essencial, DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, WME - Williams Medium E, MEM - Minimal Essential Medium.

Os cultivos de queratinócitos equino, geralmente utilizam algum tipo de substrado, esse deve mimetizar o crescimento das células *in vivo* ou ter maior similaridade possível. A literatura sugere diferentes substratos em momentos distintos dos cultivos, no primária, a partir do subcultivo ou em cultivo tridimensional.

Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel (1990) utilizaram inserto de membrana microporosa adicionando gel de plasma de frango, desde o cultivo primário, já Wunn *et al.* (1999) utilizaram substrado de gel de componentes de matriz extracelular, e quando em subcultivo utilizaram o substrato com 2% de gelatina (dado comercial não publicado).

Dahm *et al.* (2002), utilizaram co-cultivo com fibroblastos em fase pós-mitótica em seu cultivo primário, desta forma foi realizado o cultivo de fibroblastos e expandidos até que sua confluência recobrisse a parte inferior da placa e então foram induzidos a fase pós-mitótica. Essa indução torna os fibroblastos inativos, servindo como um substrato para o cultivo primário de queratinócitos, para realizar o subcultivo, utilizaram como substrato colágeno tipo I. Visser e Pollitt (2010), utilizaram apenas substrato de colágeno tipo I.

Sharma *et al.* (2013), utilizaram até o terceiro subcultivo placas com substrato de matrigel e em seu quarto subcultivo, utilizaram uma placa de inserto com arcabouço em disco poroso de poliestireno (Alvetex - REIN-AVP004-3, LGC standards, Teddington, UK) para cultivo tridimensional.

Para que uma técnica de isolamento celular seja validada é imprescindível que testes de caracterização morfofuncional das células sejam realizados.

Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel (1990) utilizaram microscopia convencional, com coloração de Hematoxilina & Eosina e Tricomio de Masson, além de microscopia eletrônica com coloração celular com Azul de Toluidina, confirmando a morfologia epitelial das células em proliferação.

Wunn *et al.* (1999) caracterizaram as células e o tecido laminar originário das células isoladas pelos testes de imunistoquímica utilizando para o teste positivo anti-vimentin (ChemMate PAB 124 IgG) e anti-bovine *hoof keratin serum* (Sigma Chemical) e para imunocitoquímica utilizaram o cromógeno vermelho (AEC substrate/chromogen, DAKO) comprovando o resultado positivo

para origem epitelial em contraste com a coloração do azul da hematoxilina (os anticorpos primários e secundários utilizados pela autora não foram descritos).

Dahm *et al.* (2002) realizaram microscopia eletrônica de transmissão para análise ultraestrutural das culturas, para imunistoquímica os cortes em criostato de epitélio labial, pele e das culturas de queratinócitos foi utilizado os anticorpos primários *pan-keratin* (LP 34, DAKO), *cytokeratin 10* (DAKO), *desmoplakin multiepitope cocktail* (PROGEN), *vimentin* (DAKO) e *Ki-67* (DIANOVA), para o teste de *Western-blot* as amostras foram incubadas com os anticorpos *keratin 14* (BIOGENETICS), *desmoplakin I/II* (NW161) e *vimentin*.

Visser e Pollitt (2010), utilizaram diversos anticorpos primários e secundários para realizar os testes de imunofluorescência, SDS-PAGE e *immunoblotting* e assim caracterizarem macromoléculas de matriz extracelular de culturas primárias de queratinócitos de pele e casco equino. Diferentes ensaios foram realizados por Sharma *et al.* (2013) como: citometria de fluxo, microscopia eletrônica (varredura e transmissão), teste colorimétrico MTT e imunocitoquímica, imunistoquímica, em que anticorpos primários que reconhecem diferentes citoqueratinas foram utilizados: *Pan-CK* (ab7753, ABCAM), *CK-5* (Sc-17090, SANTACRUZ) e *CK-14* (ab9220, ABCAM) ou *vimentin* (ab8978, ABCAM), tendo como anticorpos secundários anti-mouse IgG (A11057; A10037, INVITROGEN) ou anti-goat IgG (A11057, INVITROGEN) e por fim a adição de DAPI (P36935, INVITROGEN) os dois testes caracterizam o cultivo tridimensional de queratinócitos de pele equina.

A avaliação do potencial de proliferação e o estágio de maturação em que os queratinócitos se encontram, tanto *in vitro* quanto *in vivo* nos tecidos epidermais, também é importante. Muitos autores verificaram a expressão de moléculas p63 (uma proteína intranuclear que também caracteriza o potencial de proliferação celular), conhecidas como reguladoras de células tronco epidermais (CTE), (PARSA *et al.*, 1999; CARTER *et al.*, 2011). Linardi *et al.* (2015), demonstraram que para caracterizar e diferenciar a presença de células tronco epidermais de pele, região o coronária e lamelar do casco de equinos deve haver a combinação da expressão da molécula p63 junto com a molécula fosforilada de p63 (pp63) que é um marcador da transição de CTE para célula de amplificação de transição. Ki-67 é uma proteína presente no nucléolo e é

utilizada como marcadora de células ativas no ciclo celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000), portanto, sua presença é um pré-requisito para culturas realizadas por um período prolongado (DAHM *et al.*, 2002).

A expressão de Ki-67 em conjunto de células p63 positivas é semelhante ao padrão de expressão observado na pele e culturas epidérmicas estratificadas, em que a expressão de p63 está presente apenas dentro de células que estão proliferando ou possuem a capacidade de proliferação (YANG *et al.*, 1998; SENOO *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que as células p63 positivas na coroa do casco, região do perioplo, fornecem continuamente epitélio para gerar parede de casco em rápido crescimento, enquanto que as células p63 positivas na função lamelar tem ação na manutenção da homeostase e reparação dos tecidos, semelhantes à sua função na pele (BLANPAIN; FUCHS, 2009).

A padronização da cultura de queratinócitos provenientes de casco equino é o objetivo geral desse estudo, visando estabelecer e indicar o uso criterioso de terapias para a laminite. Os objetivos específicos contemplados foram:

- a) estabelecer uma forma de isolamento celular adequado utilizando explantes;
- b) obter uma cultura pura de queratinócitos provenientes de casco equino;

1.3. Referências

ARORA, M. Cell culture media: a review. **Materials and Methods**, v. 3, p. 175, 2013.

BELKNAP, J. K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A. M.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 1, p. 43-47, 2007.

BENOIT, S.; TOKSOY, A.; AHLMANN, M.; SCHMIDT, M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; PASPARAKIS, M.; ROTH, J.; GOEBELER, M. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 155, p. 62-66, 2006.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 1, p. 1-5, 2007.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 207-218, 2009.

BROWN, K. A.; BRAIN, S. D.; PEARSON, J. D.; EDGEWORTH, J. D.; LEWIS, S. M.; TREACHER, D. F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, p. 157-169, 2006.

CARTER, R. A.; SHEKK, V.; DE LAAT, M. A.; POLLITT, C. C.; GALANTINO-HOMER, H. L. Novel keratins identified by quantitative proteomic analysis as the major cytoskeletal proteins of equine (*Equus caballus*) hoof lamellar tissue. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3843-3855, 2010.

CARTER, R. A.; ENGILES, J. B.; MEGEE, S. O.; SENOO, M.; GALANTINO-HOMER, H. L. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, p. 543-551, 2011.

CHOI, I. Y.; GERLAG, D. M.; HERENIUS, M. J.; THURLINGS, R. M.; WIJBRANDTS, C. A.; FOELL, D.; VOGL, T.; ROTH, J.; TAK, P. P.; HOLZINGER, T. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 3, p. 499-505, 2015.

EKFALCK, A.; RODRIGUEZ-MARTINES, H.; OBEL, N. Cultivation of tissue from the matrix of stratum medium of the equine and bovine hoof walls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 11, p. 1852-1856, 1990.

EKFALCK, A.; FUNKQUIST, B.; JONES, B.; OBEL, N. Presence of receptors of epidermal growth factor (EGF) in the matrix of the bovine hoof a possible new approach to the laminitis problem. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 35, p. 321-330, 1988.

DAHM, A. M.; BRUIN, A.; LIMAT, A.; VON TSCHARNER, C.; WYDER, M.; SUTER, M. M. Cultivation and characterization of primary and subcultured equine keratinocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 2, p. 114-120, 2002.

DRYDEN, V. C.; MORRISSON, S.; BRAS, R.; MORREL, S. A. Using stem cells in clinical cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 872-873, 2013.

FALEIROS, R. R.; NUOVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 174-181, 2009.

FRENCH, K. R.; POLLIT, C. C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 3, p. 230-235, 2004.

GHAVAMI, S.; KERKHOFF, C.; CHAZIN, W. J.; KADKHODA, K.; XIAO, W.; ZUSE, A.; HASHEMI, M.; ESHRAGHI, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; KLONISCH, T.; LOS, M. S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 297-311, 2008.

GROSCHE, A.; MORTON, A. J.; POLYAK, M. M. R.; MATYJASZEK, S.; FREEMAN, D. E. Detection of calprotectin and its correlation to the accumulation of neutrophils within equine large colon during ischaemia and reperfusion. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 4, p. 393-399, 2008.

HEYMERING, H. W. 80 causes, predispositions, and pathways of laminitis. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 26, p. 13-19, 2010.

HOOD, D. M.; GROSENBAUGH, D. A.; MOSTAFA, M. B.; MORGAN, S. J.; THOMAS, B. C. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 228-234, 1993.

KELLY, S. E.; JONES, D. B.; FLEMING, S. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. **The Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 17-21, 1989.

KELLY, S. E.; HUNTER, S. A.; JONES, D. B.; CLARK, B. R.; FLEMING, S. Morphological evidence for calcium-dependent association of calgranulin with the epidermal cytoskeleton in inflammatory dermatoses. **The British Journal of Pathology**, v. 124, n. 5, p. 403-409, 1991.

LACKMANN, M.; RAJASEKARIAH, P.; IISMAA, S. E.; JONES, G.; CORNISH, C. J.; HU, S.; SIMPSON, R.J.; MORITZ, R. L.; GECZY, C. L. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 7, p. 2981-2991, 1993.

LARSSON, B.; OBEL, N.; ÅBERG, B. On the biochemistry of keratinization in the matrix of the horses hoof in normal conditions and in laminitis. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 8, p. 761-776, 1956.

LINARDI, R. L.; MEGEE, S. O.; MAINARDI, S. R.; SENOO, M.; GALANTINO-HOMER, H. L. Expression and localization of epithelial stem cell and differentiation markers in equine skin, eye and hoof. **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 213-247, 2015.

MORAES, S. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 359-370.

MOROZ, A.; BITTENCOURT, R. A. C.; ALMEIDA, R. P.; FELISBINO, S. L.; DEFFUNE, E. Platelet lysate 3D scaffold support mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improve approach in cartilage tissue engineering. **Platelets**, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2013.

MORRISSON, S. Successful use of allogenic umbilical cord-derived stem cells in nonresponsive chronic laminitic cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 603, 2011.

NOURIAN, A. R.; BALDWIN, G. I.; VAN EPS, A.W.; POLLIT, C. C. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligofrutose. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 4, p. 360-364, 2007.

NUKUI, T.; EHAMA, R.; SAKAGUCHI, M.; SONEGAWA, H.; KATAGIRI, C.; HIBINO, T.; HUH, N. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth

stimulation of normal human keratinocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 453-464, 2008.

OBEL, N. **Studies on the histopathology of acute laminitis**. Uppsala: Almqvist & Wiksell, 1948.

PARSA, R.; YANG, A.; MCKEON, F.; GREEN, H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, p. 1099-1105, 1999.

PARKS, A.; O'GRADY, S. E. Chronic laminitis: current treatment strategies. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 19, p. 396-416, 2003.

PASSEY, R. J.; XU, K.; HUME, D. A.; GECZY, C. L. S100A8: Emerging functions and regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, p. 549-566, 1999.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 27, p. 351-362, 2011.

POLLITT, C. C. **Color atlas of the horses's foot**. Londres: Mosby-Wolfe, 1995.

RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. C.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends Biotechnology**, v. 25, p. 409-416, 2007.

RICKMANN, C.; VANDAL, K.; ROULEAU, P.; TALBOT, M.; TESSIER, P. A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3233-3242, 2003.

SENOO, M.; PINTO, F.; CRUM, C. P.; MCKEON, F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 523-536, 2007.

SHARMA, R.; BARAKZAI, S. Z.; TAYLOR, S. E.; DONADEU, F. X. Epidermal-like Architecture obtained from equine keratinocytes in three-dimensional cultures. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 8, p. 627-636, 2013.

SHIMABUKURO, J.; YAMAOKA, A.; MURATA, K.; KOTANI, E.; HIRANO, T.; NAKAJIMA, Y.; MATSUMOTO, G.; MORI, H. 3D co-cultures of keratinocytes and melanocytes and cytoprotective effects on keratinocytes against reactive oxygen species by insect virus-derived protein microcrystals. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 64-69, 2014.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

STEWART, M.; STEWART, A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 27, p. 243-261, 2011.

VAN LENT, P. L.; GREVERS, L.; BLOM, A. B.; SLOETJES, A.; MORT, J. S.; VOGL, T.; NACKEN, W.; VAN DEN BERG, W. B.; ROTH, J. Myeloid related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. **Annals Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 1750-1758, 2008.

VISSER, M. B.; POLLITT, C. C. Characterization of extracellular matrix macromolecules in primary cultures of equine keratinocytes. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 6, p.16, 2010.

VOGL, T.; TENBROCK, K.; LUDWIG, S.; LEUKERT, N.; EHRHARDT, C.; VAN ZOELEN, M. A. D.; NACKEN, W.; FOELL, D.; VAN DER POLL, T.; SORG, C.; ROTH, J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1042-1049, 2007.

WATTS, A. E. Use of stem cells in equine musculoskeletal disorders. **Equine Veterinary Education**, v. 26, p. 492-498, 2014.

WUNN, D.; WARDROP, K. J.; MEYERS, K.; KRAMER, J.; RAGLE, C. Culture and characterization of equine terminal arch endothelial cells and hoof keratinocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 1, p. 128-132, 1999.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLETT, E.; FLEMING, M. D.; DÖTSCH, V.; ANDREWS, N. C.; CAPUT, O.; MCKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**, v. 2, n. 3, p. 305-316, 1998.

CAPÍTULO 2:

2. Artigo Científico

Artigo submetido à revista Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, normas de publicação vigentes disponíveis em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1932-7005/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1932-7005/homepage/ForAuthors.html)).

2.1. Título: Cultivo em Monocamada e Caracterização de Queratinócitos Lamelares do Casco Equino: Utilizando Explantes

MONOLAYER CULTURE AND CHARACTERIZATION OF EQUINE HOOF LAMELLAR KERATINOCYTES: USING EXPLANTS

João Pedro Hübbe Pfeifer¹, Vitor Hugo Santos¹, Jaqueline Brandão de Souza¹,
Betsabéia Heloísa Gentilha Milani¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves², Elenice
Deffune³, Ana Liz Garcia Alves^{1*}.

¹Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18618-681, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Clínica Veterinária (Serviço de Patologia Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18618-681, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Urologia (Divisão Hemocentro), Faculdade de Medicina, UNESP - Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

*Correspondence to: A. L. G. Alves, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Rubião Junior, s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil. Telephone number: +55 14 3880 2025. E-mail: anaalves@fmvz.unesp.br

Resumo

É notória a importância do casco na saúde dos equinos, mas o conhecimento em nível celular é pouco entendido. Estudos envolvendo o cultivo de queratinócitos equinos são escassos. Sabe-se que o desenvolvimento de cultivos de queratinócitos *in vitro* é uma condição para estudos sobre a biologia molecular, crescimento e diferenciação celular. Alguns métodos já estão estabelecidos, como para cultivo de queratinócitos de pele, mas poucas metodologias são encontradas para queratinócitos lamelares. O objetivo desse estudo, foi padronizar o cultivo de queratinócitos provenientes de casco equino, visando futuramente associar ao estudo da medicina regenerativa para assim estabelecer um modelo experimental *in vitro* e indicar o uso criterioso de terapias regenerativas para a laminite equina. Desta forma, foi realizado o cultivo em monocamada e caracterização de queratinócitos lamelares. Para isso, o método de cultura primária utilizado foi através de explantes obtidos de três regiões do casco (dorso-medial, dorsal e dorso-lateral). As células foram caracterizadas para os marcadores anti pan-cytokeratin (AE1/AE3), vimentin (V9), p63 (4A4) e Ki-67 (MIB-1) nos cultivos e nos explantes. As células foram cultivadas até terceira passagem, tendo marcação positiva para pan-CK, p63 e Ki-67 e fraca marcação para vimentina. Já as lâminas epidermais não tiveram marcação de vimentin e Ki-67, porém marcaram acentuadamente para pan-CK e p63. Este

estudo demonstrou a exequibilidade do uso de explantes lamelares do casco de equinos, como forma de isolamento de queratinócitos em cultivos primários, bem como caracterizou a habilidade de proliferação desses queratinócitos em monocamada.

Palavras-chave: Casco, Cultura Celular, Equinos, Laminite, Queratinócitos.

Abstract

It is evident the importance of the hoof health of horses, but the knowledge at the cellular level is poorly understood. Studies involving the culture of equine keratinocytes are scarce. The development of keratinocyte cultures in vitro is a condition for studies on molecular biology, cell growth and differentiation. Some methods are already established, such as for culture of skin keratinocytes, but few methodologies are found for lamellar keratinocytes. The aim of this study was to standardize the cultivation of keratinocytes from equine hoof, aiming future associate with the study of regenerative medicine so as to establish an experimental in vitro model and indicate the wise use of regenerative therapies for equine laminitis. In this way, monolayer culture and characterization of lamellar keratinocytes were performed. For this, the method of primary culture used was through explants obtained from three regions of the hoof (dorso-medial, dorsal and dorso-lateral). Cells were characterized for anti pan-cytokeratin (AE1 / AE3), vimentin (V9), p63 (4A4) and Ki-67 (MIB-1) markers in cultures and explants. Cells were grown to third passage, having positive marking for pan-CK, p63 and Ki-67 and poor labeling for vimentin. Already the epidermal laminae were not labeling for vimentin and Ki-67, but pan-CK and p63 had sharp labeling. This study demonstrated the feasibility of using lamellar

explants in equine hoofs as a form of isolating keratinocytes in primary cultures, as well as characterizing the proliferation ability of these keratinocytes in monolayers.

Keywords: Cell Culture, Equine, Hoof, Keratinocytes, Laminitis.

1. Introdução

Diversos estudos buscam elucidar e caracterizar tecidos hígidos de origem epitelial, como pele, olhos e casco, para que possam identificar os mecanismos de desenvolvimento de enfermidades nesses tecidos (Parsa *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2011; Shimabukuro *et al.*, 2014; Linardi *et al.*, 2015), bem como a dificuldade de cicatrização ou reparação de tecidos queratinizados em equinos tem originado pesquisas *in vitro*, principalmente lesões de pele e casco, particularmente na laminite. Estes estudos focam no comportamento e também na expressão de padrões proteicos das células do casco (Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel 1990; Wunn *et al.*, 1999; Dahm *et al.*, 2002; Visser e Pollitt, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Pawlak *et al.*, 2014).

O casco equino é formado por epiderme em diferentes estágios de queratinização, subdivididos em estrato externo ou parede do casco, estrato médio e estrato interno, nesse último estão localizadas as lâminas epidermais primárias (LEPs) e secundárias (LESs) onde os queratinócitos estão presentes junto a membrana basal (Pollitt, 1995).

Como exemplo no desencadeamento da laminite nos equinos, os casos de endotoxemias, as regiões alvo frequentemente afetadas são as interfaces dermo-epidérmicas das lâminas secundárias causando a laminite (French & Pollitt, 2004; Belknap *et al.*, 2007; Pollitt, 2007).

Dada a devida importância do casco na saúde dos equinos, o conhecimento no que diz respeito às células ainda é pouco entendido (Carter *et al.*, 2011), sendo o desenvolvimento de estudos para cultivos de queratinócitos *in vitro* uma condição para o entendimento sobre o crescimento celular, diferenciação e a biologia celular e molecular (Dahm *et al.*, 2002).

O objetivo desse estudo, foi padronizar o cultivo de queratinócitos provenientes de casco equino, visando futuramente associar ao estudo da medicina regenerativa para assim estabelecer um modelo experimental *in vitro* e indicar o uso criterioso de terapias regenerativas para a laminite equina.

2. Material e Métodos

Este estudo foi registrado sob o protocolo CEUA 151/2016 e conduzido de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

2.1. Coleta de Tecido Laminar

Foram colhidas três amostras de tecido laminar, de um equino garanhão, 05 anos, 500 Kg, raça Mangalarga que veio a óbito isento de histórico ou evidência de alteração ou enfermidade de casco ou região. As amostras foram colhidas uma hora *post mortem*.

Os fragmentos foram colhidos conforme a técnica utilizada por Wunn *et al.* (1999), com modificações. As regiões coletadas de cada casco foram no terço médio-proximal na face dorsal (D), dorso lateral (DL) e dorso medial (DM), todas aproximadamente dois centímetros distais da banda coronária.

O membro foi serrado na região do terço médio do metacarpo e lavado com água e sabão para retirada de sujidades. Após a limpeza, os cascos os foram submetidos à antissepsia, e panos de campos estéreis foram posicionados na porção do membro até a banda coronária.

A retirada dos fragmentos foi realizada segundo Wunn *et al.*, (1999) modificada, utilizando uma serra-copo de 1,5 cm de diâmetro (Starret, BRA), acoplada a uma furadeira (Bosch, BRA) ambas estéreis. A perfuração foi irrigada com solução fisiológica a fim de evitar o aquecimento da amostra até se atingir a profundidade de aproximadamente 2 cm de acordo com a percepção de a serra tocar a derme. Subseqüentemente, ainda com serra-copo os fragmentos foram luxados da derme com movimentos proximais a distais, retirados e acondicionados em tubos cônicos contendo meio tampão salino PBS (Gibco, USA) para lavagem. Foram realizadas três lavagens em PBS para então os fragmentos serem acondicionados em meio de transporte contendo meio tampão zwitteriônico HEPES (Gibco, USA) com antibiótico-antimicótico (anfotericina B, penicilina e estreptomicina) e conduzidos ao laboratório.

2.2. Isolamento de Queratinócitos

O isolamento dos queratinócitos utilizando explantes foi baseado nos trabalhos de Ekcfalck, Rodriguez-Martinez & Obel (1990) e Sharma *et al.*, (2013). No laboratório os fragmentos foram submetidos a uma lavagem tripla utilizando iodopovidine com diluição decrescente a 4%, 2% e 1%, e após foi realizada uma última lavagem com 30 mL de PBS. Finalizada a lavagem os fragmentos foram acondicionados em tubos tipo falcon adicionados HEPES (Gibco, USA) + Antibiótico-antimicótico (Gibco, USA) + amicacina (Teuto, BRA),

e mantidos *overnight* (18h) a 4°C. Após esse período, foram separadas as lâminas epidérmicas da matriz do casco, utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 24. Estas lâminas epidérmicas foram cortadas e pesadas, sendo distribuídas em duplicata com pesos iguais nas placas de *Petri*.

2.3. Cultivo de Queratinócitos

O meio de cultura comercial utilizado foi DMEM *calcium free* (Gibco, USA), sendo suplementado com: soro fetal bovino 5% (Gibco, USA); EGF - fator de crescimento epidermal 10 ng/mL (Gibco, USA); BPE - extrato de pituitária bovina 30 µg/mL (Gibco, USA); hidrocortisona 0,4 µg/mL (Blau Farmacêutica, BRA); insulina 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA); cálcio 0,6 mM (Halixlstar, BRA); antibiótico-antimicótico 300 µL (Gibco, USA) e amicacina 2,2 µL (Teuto, BRA). As culturas primárias foram realizadas em placas de *Petri* durante 10 dias na presença dos explantes, incubadas em estufa de ambiente controlado com 5% de CO₂ a 37°C, tendo reposição do meio de cultura e acompanhamento do crescimento celular em microscópio de contraste de fase invertido, a cada 48 a 72h.

Após o cultivo primário apresentar confluência de aproximadamente 80%, foi realizada a retirada dos explantes e procedida a tripsinização por 10 minutos, utilizando Tripsina 0,25% (Gibco, USA). Em seguida, as células foram centrifugadas a 251 x g, durante 10 minutos lavadas com meio HEPES (Gibco, USA) e SFB (Gibco, USA).

Durante o subcultivo, as células foram cultivadas em placas de 06 poços (Sarstedt, GER) e incubadas em estufa de ambiente controlado com (5% de CO₂ a 37°C), tendo reposição do meio de cultivo a cada 48 a 72h e acompanhamento

do crescimento celular em microscópio de contraste de fase invertido (Carl Zeiss Company, GER). Ao final da terceira passagem, as culturas foram caracterizadas.

2.4. Imunofluorescência da Cultura Celular

Uma lamínula de vidro específica para cultivo celular, foi inserida em cada um dos seis poços de uma placa e adicionado meio de cultivo. Cada cultivo foi transferido em quadruplicatas cuidadosamente para cada poço da placa, sendo “gotejadas” em cima das respectivas lamínulas e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após a adesão das células às lamínulas, foi realizada a etapa de fixação, lavando as amostras três vezes utilizando 1 mL de PBS + Água Deionizada (1:9). Após as lavagens foi adicionado a cada poço 1 mL de álcool metílico - CH₃OH e incubado a 4°C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada novamente a lavagem por três vezes e processada a etapa de permeabilização, adicionando Tween 20 0,2% (DAKO, DK) por 10 min e nova lavagem por três vezes. Procedeu-se com o bloqueio das amostras utilizando Protein Block (Spring Bioscience, USA), 2 a 3 gotas ou até cobrir a lamínula e incubado a 27°C por 20 minutos. Subsequente, foram adicionados os anticorpos primários e deixados incubados *overnight* a temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram: pan-Cytokeratin AE1/AE3 (Santa Cruz Biotechnology, USA) e Vimentin (V9, Santa Cruz Biotechnology, USA) ambos na diluição de 1:300, também foram utilizados os anticorpos primários p63 (4A4, Santa Cruz Biotechnology, USA) e Ki-67 (Mib-1-clone, DAKO, DK) ambos na diluição de 1:100. Essa etapa foi seguida pela lavagem com PBS e adição do anticorpo secundário AlexiaFluor 532 anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) 5 µg/mL e incubado no escuro por 30

minutos, após foi adicionado diamidino-2-phenylindole - DAPI (Sigma-Aldrich, USA) com diluição de 1:1000 em cada lamínula. Posteriormente as amostras foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 (Leica Microsystems, GER).

2.5. Imunofluorescência Explante Lamelar

Fragmentos de explantes lamelares foram fixados em solução de formol tamponado 10% e emblocados em parafina. As amostras foram cortadas em micrótomo manual (Leica Microsystems, GER), com cortes de 4 μ m e distendido em lâminas para imunoistoquímica (Starfrost, GER). Seguiu-se com a desparafinização das lâminas processando as etapas de lavagem: Xilol I e Xilol II ambos 10 minutos; álcool absoluto I, II, III durante 05 minutos cada; álcool 95° e álcool 85° também por 05 minutos cada, ao final desta etapa dez lavagens com água deionizada. Após realizou-se a recuperação antigênica utilizando uma solução de citrato pH 6,0 durante 30 minutos em panela de pressão (Dako, DK). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de metanol + peroxidase por 10 minutos no escuro. As etapas seguintes foram realizadas da mesma forma que descrito na seção 2.4, a partir do uso do Protein Block; salvo as diluições dos seguintes anti-corpos: p63 (4A4, Santa Cruz Biotechnology, USA) e Ki-67 (Mib-1-clone, DAKO, DK) ambos na diluição de 1:50 (Robertson et al., 2008).

3. Resultados

3.1. Cultivo de queratinócitos pelo método de explante

Após três dias dos explantes plaqueados, pequenas células com morfologia ovóide/cubóide surgiram sob os explantes aderidos à placa (Figura 1a). Durante esse período, alguns explantes estavam com pouca aderência à placa, o que mais tarde demonstrou pouca celularidade oriunda dos mesmos. Foi observado que durante os sete dias seguintes a partir do plaqueamento, a proliferação celular com morfologia ovóide/cubóide manteve-se e células aderidas com prolongamentos citoplasmáticos estavam presentes. Ao décimo dia, os explantes foram retirados das placas de cultivo, as quais foram mantidas até atingir a confluência para realizar a passagem; quando a confluência foi atingida nas monocamadas as células foram tripsinizadas.

Células com característica fibroblastóide não foram observadas nos cultivos, nem quando em subcultura.

Um agrupamento de células com formação estratificada (Figura 1b), foi observado, provavelmente por uma adaptação ao ambiente *in vitro*, já que são células de origem do epitélio estratificado queratinizado.

3.2. Caracterização dos Cultivos em Monocamada por Imunofluorescência

O anticorpo pan-CK, teve forte marcação nas células em subcultivo de todos os três cultivos. Esta positividade confirma que as células cultivadas são queratinócitos lamelares (Figura 2a). O anticorpo anti-vimentina, teve positividade em poucas células e outras não teve marcação (Figura 2b); Podemos avaliar o potencial de proliferação pela marcação dos anticorpos Ki-67

e p63, os quais tiveram uma marcação moderada em grande parte dos subcultivos (Figuras 2c e 2d), Ki-67 teve a marcação menos evidente que p63.

3.3. Caracterização dos Explantes por Imunofluorescência

A análise de imunofluorescência dos explantes após a retirada do cultivo primário demonstrou uma marcação semelhante a dos cultivos em monocamada, havendo grande presença de células tanto nas LEPs quanto nas LESs. Todos os explantes analisados tiveram marcação positiva para pan-CK (Figura 3a). É importante ressaltar que a marcação limitou-se às células da camada germinativa, adjacente à membrana basal das LESs, denotando que às células marcadas que permaneceram nesses explantes não migraram para a placa de cultivo, possivelmente apenas os queratinócitos axiais nas LESs desses explantes realizaram a migração. Isso é confirmado pela moderada marcação da p63 (Figura 3b), em células adjacentes à membrana basal das LESs. O anti-corpo Ki-67, não apresentou marcação nos explantes analisados (Figura 3c) e para vimentina, a marcação restringiu-se a resquícios de lâminas dérmicas secundárias (Figura 3d).

4. Discussão

Nesse estudo, o cultivo e caracterização de queratinócitos lamelares provenientes de equinos hígdos utilizando explantes como cultivo primário obteve êxito. Esse método baseou-se nos trabalhos de Ekcfalck, Rodriguez-Martinez e Obel (1990) e Sharma *et al.* (2013).

Por meio dos resultados obtidos, pode-se avaliar que as concentrações do meio de cultivo e dos suplementos utilizados foram determinantes para o realizar o cultivo de queratinócitos lamelares em monocamada.

O meio de cultivo e os suplementos utilizados tiveram papel essencial na qualidade de passagem dos cultivos, principalmente quanto a concentração de cálcio que pode influenciar a proliferação e diferenciação celular (Hennings *et al.*, 1980).

De acordo com Visser e Pollitt, (2010) e Dahm *et al.* (2002), o meio de cultivo ideal para queratinócitos de origem lamelar é a utilização de meio DMEM com baixa concentração de cálcio (0,6 mM).

A utilização de 5% SFB desde o cultivo primária foi importante e corrobora com os resultados, pois a suplementação de SFB em torno de 2% pode levar ao estresse celular, e a concentração de 10% tende as células a formarem morfologia fibroblastóide, sendo que a concentração de 5% demonstrou ser ideal para a cultura de queratinócitos pelo método de explante (Sharma *et al.*, 2013).

Fibroblastos comumente aparecem nos cultivos primários, sendo separados da placa ao longo das tripsinizações, ou quando enzimas específicas são utilizadas para separar apenas esse tipo celular (Visser e Pollitt, 2010). A ausência de fibroblastos nos cultivos, pode ter ocorrido devido ao cuidado ao separar as lâminas epidermais do tecido dermal das amostras coletadas. Visser e Pollitt, (2010) relatam que tal cuidado é essencial para que não haja contaminação por fibroblastos nos cultivos de queratinócitos.

A avaliação da viabilidade e densidade não foram realizadas através de contagem celular, nem em câmara de *Neubauer* ou por citometria, pois a presença de resquícios de explantes não permitiram a visualização limpa dos

quadrantes da câmara de *Neubauer* e em citometria havia a possibilidade de causar um resultado falso positivo. Na literatura não foram encontrados relatos de problemas para contagem celular em cultivos primários com explantes, essa dificuldade poderia ter sido evitada se os cortes dos explantes fossem maiores ou até filtrando as células quando tripsinizadas.

A caracterização dos cultivos de queratinócitos realizada por imunofluorescência demonstrou a pureza desses cultivos pela origem tecidual e estágio de diferenciação. A positividade para pan-Cytokeratin nas células cultivadas e nas lâminas epidermais utilizadas como explantes, confirma a origem epitelial dessas células e dos explantes, devido a similaridade dos queratinócitos equinos com queratinócitos de outras espécies, pois a morfologia e a expressão de citoqueratinas que são marcadores de filamentos intermediários primários de células epiteliais (Wilkinson *et al.* 1989; Wattle, 1998; Visser e Pollitt, 2010).

A vimentina é conhecida por marcar células ou tecidos de origem mesenquimal, como fibroblastos presentes na derme. Também é utilizada como marcador de tecidos específicos, como cultivo de queratinócitos de pele equina, onde esses não expressam vimentina (Dahm *et al.*, 2002 e Sharma *et al.*, 2013). Outros estudos que avaliaram queratinócitos lamelares, demonstraram que esses queratinócitos podem expressar vimentina quando em cultivo (Wunn *et al.* 1999; Visser e Pollitt, 2010), e essa expressão positiva para vimentina pode ser uma adaptação ao ambiente *in vitro* (Coggi *et al.* 1989; Richard *et al.* 1990).

O resultado positivo para vimentina em poucas células, pode justificar a questão adaptativa das células ao ambiente *in vitro*. Outro resultado que

confirma a teoria encontrada na literatura foi que os explantes não expressaram vimentina, sendo essa restrita a região de lâmina dérmica secundária.

A avaliação do potencial de proliferação e o estágio de maturação em que os queratinócitos se encontram, tanto *in vitro* quanto *in vivo* nos tecidos epidermais, é importante para sabermos o quanto o cultivo ainda é capaz de proliferar. A expressão de p63 e Ki-67 foi considerada moderada nas células em cultivo, tendo em vista que os cultivos foram mantidos até a terceira passagem, e essa característica de perder o potencial proliferativo é verificado principalmente em cultivos prolongados. A p63 é conhecida também como molécula reguladora de células tronco epidermais (CTE), uma proteína intranuclear que caracteriza o potencial de proliferação celular (Parsa et al., 1999; Carter et al., 2011). Linardi et al. (2015), demonstraram que para caracterizar e diferenciar a presença de células tronco epidermais de pele, região coronária e lamelar do casco de equinos deve haver a combinação da expressão da molécula p63 junto a molécula fosforilada de p63 (pp63) que é um marcador da transição de CTE para célula de amplificação de transição. Já, Ki-67 é uma proteína presente no nucléolo de queratinócitos que estão ativos no ciclo celular (Scholzen e Gerdes, 2000), portanto, sua presença é um pré-requisito para culturas realizadas por um período prolongado (Dahm et al., 2002).

A expressão de Ki-67 em conjunto de células p63 positivas é semelhante ao padrão de expressão observado na pele e cultivos epidérmicos estratificados. A expressão de p63 está presente apenas em células em proliferação ou que possuem essa capacidade (Yang et al. 1998; Senoo et al. 2007). Sugerindo o que foi descrito por Blanpain e Fuchs, (2009) que as células p63 positivas na

coroa do casco, região do perioplo, fornecem continuamente epitélio para gerar parede de casco em rápido crescimento, enquanto as células p63 positivas na função lamelar tem ação na manutenção da homeostase e reparação dos tecidos, semelhante à sua função na pele.

Entretanto, nas lâminas epidermais utilizadas como explantes, a marcação de Ki-67 não foi observada, apenas uma fraca marcação de p63, possivelmente pelo estágio e estresse celular que essas células que não migraram para a placa de cultivo estavam submetidas, visto que a marcação dessas duas moléculas denotam o potencial proliferativo dos queratinócitos.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou a exequibilidade do uso de explantes lamelares do casco de equinos, como forma de isolamento de queratinócitos em cultivos primários, bem como caracterizou a habilidade de proliferação desses queratinócitos em monocamada. Os resultados apontam para a necessidade de implementação do protocolo usado, com técnicas e metodologias que promovam a maior migração das células do explante para o ambiente de cultivo. Esta implementação servirá de ferramenta como modelo experimental para a avaliação de estudos terapêuticos que possam elucidar o comportamento celular e avaliar o potencial da utilização de medicina regenerativa, como tratamento para laminite equina.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Engenharia Celular - Hemocentro da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu, sob coordenação da Prof^a Elenice Deffune; ao Laboratório de Imunoistoquímica, coordenado pela Prof^a Renée Laufer Amorim; ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, Unesp Botucatu, à técnica Shelly F. Carvalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

6. Referências

Belknap JK, Giguère S, Pettigrew A *et al.* 2007; Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet J* **39**: 43-47.

Blanpain C, Fuchs E 2009; Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 207-218.

Carter RA, Shekk V, de Laat MA *et al.* 2010; Novel keratins identified by quantitative proteomic analysis as the major cytoskeletal proteins of equine (*Equus caballus*) hoof lamellar tissue. *J Anim Sci* **88**: 3843-3855.

Carter RA, Engiles JB, Megee SO *et al.* 2011; Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine Vet J* **43**: 543-551.

Coggi G, Dell'Orto P, Braiadotti P *et al.* 1989; Coexpression of intermediate filaments in normal and neoplasia human tissues: a reappraisal. *Ultrastruct Pathol* **13**: 501-514.

Dahm AM, de Bruin A, Limat A *et al.* 2002; Cultivation and characterization of primary and subcultured equine keratinocytes. *Equine Vet J* **34**: 114-120.

Ekfalck A, Rodriguez-Martines H, Obel N. 1990; Cultivation of tissue from the matrix of stratum medium of the equine and bovine hoof walls. *Am J Vet Res* **11**: 1852-1856.

French KR, Pollitt CC. 2004; Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine Vet J* **3**: 230-235.

Hennings H, Michael D, Cheng C *et al.* 1980; Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**: 245-254.

Hood DM, Grosenbaugh DA, Mostafa MB *et al.* 1993; The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J Vet Intern Med* **4**: 228-234.

Linardi RL, Megee SO, Mainardi SR *et al.* 2015; Expression and localization of epithelial stem cell and differentiation markers in equine skin, eye and hoof. *Vet Dermatol* **26**: 213-247.

Parks A, O`Grady SE. 2003; Chronic laminitis: current treatment strategies. *Vet Clin North Am Equine Pract* **19**: 396-416.

Parsa R, Yang A, Mckeeon F *et al.* 1999; Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **113**: 1099-1105.

Pawlak EA, Geor RJ, Watts MR *et al.* 2014; Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and related genes in equine digital lamellae and in cultured keratinocytes. *Equine Vet J* **46**: 203-209.

Pollitt CC. 1995; *Color atlas of the horses's foot*. Mosby-Wolfe, Londres.

Pollitt CC. 2007; 'Laminitis Pathophysiology' in *Equine Podiatry*, Floyd AE, Mansmann RE. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, EUA; 313-319.

Richard MH, Viac J, Reano A *et al.* 1990; Vimentin expression in normal human keratinocytes grown in serum-free defined MCDB 153 medium. *Arch Dermatol Res* **282**: 512-515.

Robertson D, Davage K, Reis-Filho JS *et al.* 2008; Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol* **9**: 13.

Senoo M, Pinto F, Crum CP *et al.* 2007; p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* **129**: 523-536.

Sharma R, Barakzai SZ, Taylor SE *et al.* 2013; Epidermal-like Architecture obtained from equine keratinocytes in three-dimensional cultures. *J Tissue Eng Regen Med* **10**: 627-636.

Shimabukuro J, Yamaoka A, Murata K *et al.* 2014; 3D co-cultures of keratinocytes and melanocytes and cytoprotective effects on keratinocytes against reactive oxygen species by insect virus-derived protein microcrystals. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **42**: 64-69.

Scholzen T, Gerdes J. 2000; The Ki-67 protein: from the known and the unknown, *J Cell Physiol* **182**: 311-322.

Visser MB, Pollitt CC. 2010; Characterization of extracellular matrix macromolecules in primary cultures of equine keratinocytes. *BioMed Central Vet Res* **6**: 16.

Wattle O. 1998; Cytokeratins of the equine hoof wall, chestnut and skin: bio- and immunohisto-chemistry. *Equine Vet J Suppl* **26**: 66-80.

Wilkinson JE, Lee CS, Lillie JH *et al.* 1989; Ultrastructure of cultured canine oral keratinocytes. *Am J Vet Res*, **50**: 1161-1166.

Wunn D, Wardrop KJ, Meyers K *et al.* 1999; Culture and characterization of equine terminal arch endothelial cells and hoof keratinocytes. *Am J Vet Res* **60**: 128-132.

Yang A, Kaghad M, Wang Y *et al.* 1998; p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**: 305-316.

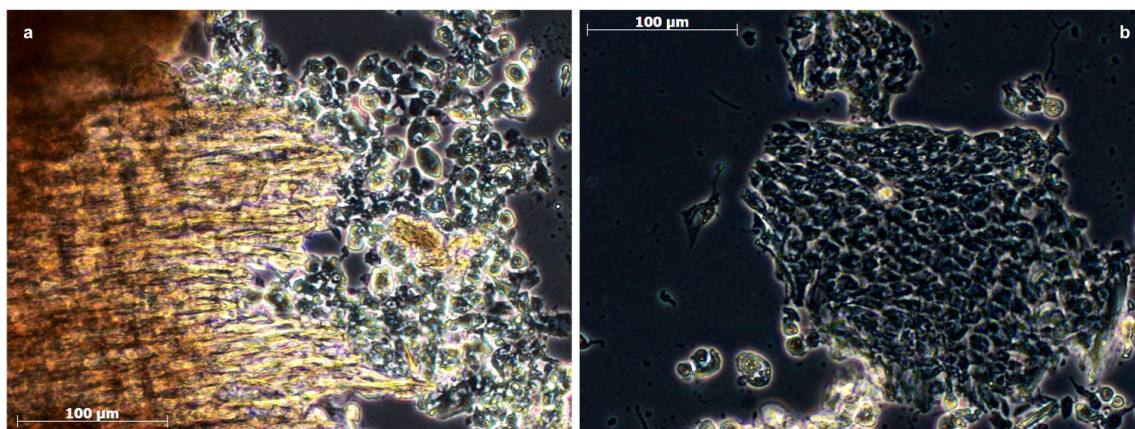


Figura 1. Microscopia invertida com contraste de fase dos cultivos primários em monocamada. Em (a) mostra as células migrando para a placa de cultivo, aparecendo por debaixo do explantes; (b) agrupamento de células, em formação epitelial estratificada, característica dos queratinócitos devido a sua origem epidermal e células ovóides também são observadas. As fotomicrografias estão em x 20.

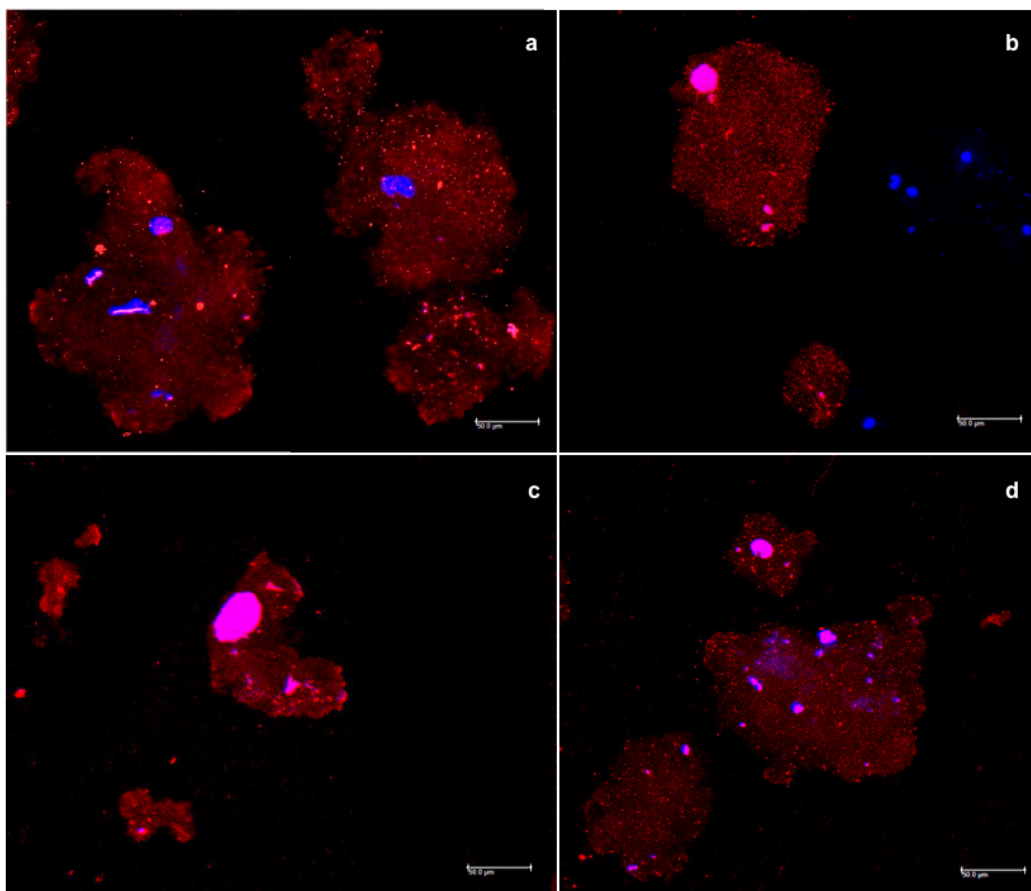


Figura 2. Imunofluorescência dos cultivos de queratinócitos em monocamada. Marcação com fluoróforo vermelho devido ao anticorpo secundário (AlexiaFluor 532) e azul devido a marcação de núcleo por DAPI. (a) a positividade para pan-CK devida a marcação citoplasmática em vermelho, e em azul a marcação do nuclear; (b) marcação citoplasmática em vermelho e núcleo rósea (AlexiaFluor 532 + DAPI) positiva para vimentina, também foi observado a marcação negativa para vimentina, pontos azuis; (c) positividade para Ki-67, evidente pelo núcleo rósea devida a somatória do vermelho secundário para o anticorpo nuclear Ki-67 e o azul do DAPI, que marca núcleo celular; (d) positividade para p63, por ser um marcador nuclear somado ao DAPI, também observa-se a coloração rósea do núcleo. Algumas marcações pontuais podem ser observadas em todas as imagens, mas sem relevância. Fotomicrografia em microscópio confocal a laser, todas as seções em aumento x 40.

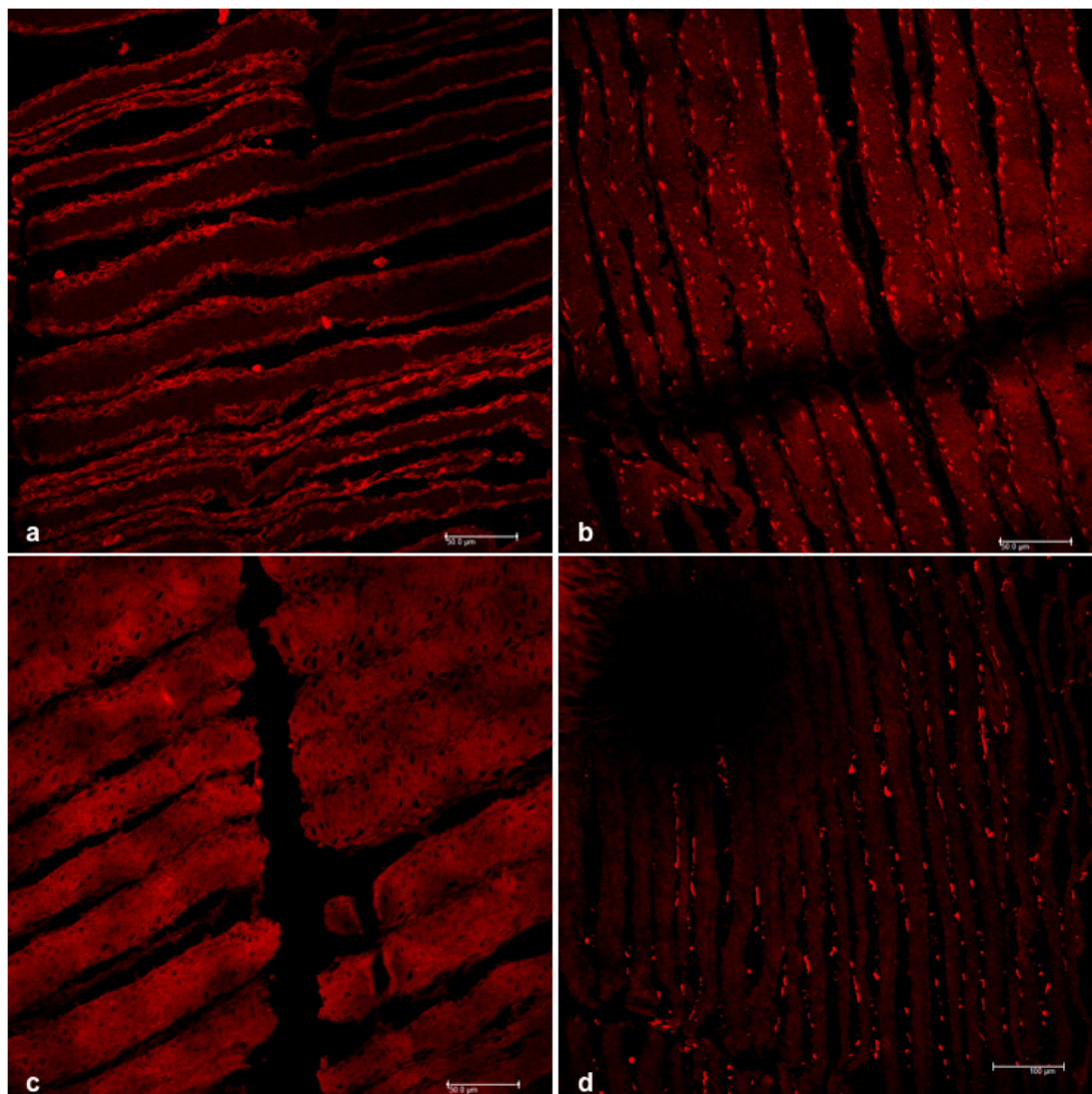


Figura 3. Imunofluorescência dos explantes (lâminas epidermais) após a retirada do cultivo primário. (a) marcação citoplasmática (vermelho intenso) de pan-CK em células da camada basal, nas lâminas secundárias; (b) marcação nuclear de p63 igualmente nas células presentes na camada basal das lâminas secundárias; (c) marcação negativa de Ki-67, os núcleos celulares apresentam-se escuros; (d) a marcação de vimentina limitou-se à região das lâminas secundárias dérmicas. Fotomicrografia em microscópio confocal a laser, todas as seções em aumento x 40, apenas 'd' que tem aumento x 20.

Considerações Finais

1. Dificuldades Encontradas

Inicialmente, quando foi realizado o delineamento do experimento e alguns estudos pilotos, foi tomada a decisão de qual meio de cultivo utilizar, foi feita cotação do meio de cultivo sem cálcio recomendado pela literatura, sendo esse de alto valor, então foram realizadas diversas tentativas de quelar o cálcio presente em outro meio de cultivo celular de menor custo utilizando citrato de sódio. Foram testadas diversas amostras desse meio de cultivo e em um primeiro momento o cálcio era quelado para uma menor concentração, mas menos de 24h após a mesma amostra apresentava a concentração de cálcio inicial, desta forma o quelante utilizando citrato de sódio demonstrou-se instável, com isso foi decidido comprar o meio de cultivo sem cálcio importado e prorrogar o início do experimento até que o meio fosse recebido.

Posteriormente, tivemos problema quanto a redução do número de cultivos primários, devido a contaminação por fungo em três cultivos iniciais, e em um segundo momento, com a cultura tridimensional em placa de inserto, também verificamos contaminação por fungo (não especificado) em apenas um poço de cultivo. Essas contaminações podem ter sido decorrentes pelo fato de que cultivos de outros tipos celulares estavam sendo realizados na mesma estufa, mas não descarta-se que as contaminações tenham ocorrido por erros durante a manipulação dessas amostras.

Outra etapa que encontramos adversidade, foi no segundo piloto durante a passagem dos cultivos (tripsinização), tanto para P1 quanto para P2, em que a contagem celular e avaliação da viabilidade por Azul de Tripán utilizando câmara de Neubauer não foi possível. Devido aos resquícios de explantes e outros tipos celulares que inviabilizaram essa contagem, pois atrapalhavam a visualização das células em microscópio de contraste de fase invertido, sendo corrigido realizando a remoção mecânica dos explantes e após sendo realizada a tripsinização das células aderidas.

Essas dificuldades encontradas serviram de aprendizado e alerta para futuros trabalhos.