

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 29/05/2018.

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.

1.3. 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.

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.