

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO  
MODELO *IN VITRO* PARA A DERMATOSPARAXIA OVINA

JOÃO PEDRO MARMOL DE OLIVEIRA

Botucatu – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO MODELO  
*IN VITRO* PARA A DERMATOSPARAXIA OVINA

JOÃO PEDRO MARMOL DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Associado Rogério Martins Amorim

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

Oliveira, João Pedro Marmol de.

Potencial do uso de células tronco mesenquimais como modelo in vitro para a dermatosparaxia ovina / João Pedro Marmol de Oliveira. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Rogério Martins Amorim  
Capes: 50501062

1. Ovinos. 2. Síndrome de Ehlers-Danlos. 3. Expressão gênica. 4. Células-tronco mesenquimais. 5. Colágeno. 6. Astenia. 7. Dermatopatias.

Palavras-chave: Astenia cutânea; Colágeno; Expressão gênica; Ovinos; Síndrome de Ehlers-Danlos.

Nome do autor: João Pedro Marmol de Oliveira

Título: POTENCIAL USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO  
MODELO *IN VITRO* PARA A DERMATOSPARAXIA OVINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele dos Santos Martins

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA – USP – Pirassununga, São Paulo.

Data da defesa: 20 de junho 2023.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, meus pais Souvenir Oliveira e Silmara Marmol, meus irmãos Adrielly e Otavio e meu sobrinho Henrique, que veio ao mundo no início do meu mestrado, por todo apoio e incentivo em minha carreira, e não desistirem de mim quando eu mesmo já duvidava.

Ao meu companheiro Murilo Vigilato, por ser um dos meus grandes incentivadores na pós-graduação e por estar presente e me apoiando durante esta trajetória.

À minha amiga Cristiana Bromberger, que sempre esteve ao meu lado e que foi uma das maiores amizades que Botucatu me trouxe, dividindo nossas aflições e vitórias da vida acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos e colegas de grupo de pesquisa Beatriz Kamura, Natielly Chimenes e Lucas Ferreira, por todo apoio, ajuda e diversões, são três amigos que levarei para sempre comigo, muito obrigado por estarem presentes, o mestrado foi muito mais leve com vocês ao lado. E ao aluno de iniciação científica Paulo por toda ajuda com o projeto e parceria.

Aos amigos Lukas Albertino, Amanda Corvino, Lisandra Camargo e Juliana Tamy, que estiveram ao meu lado e acompanharam minha trajetória acadêmica e a todos amigos e colegas que passaram pela minha vida durante todos estes anos.

Aos professores José Paes de Oliveira Filho, Marjorie de Assis Golim e Renée Laufer Amorim, pelo auxílio e parceria na realização deste projeto.

À COOPERMOTA, pelo fomento na realização do projeto por meio do fornecimento de ração para os animais utilizados na pesquisa.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pela oportunidade em desenvolver minha pesquisa de mestrado, por todo apoio e ensinamentos na pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, muito obrigado!

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados para RT-qPCR.....	36
---	----

**LISTA DE TABELAS**

Tabela suplementar 1 – Viabilidade celular de células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo.....	40
Tabela suplementar 2 – Médias e desvio padrão da quantidade relativa de transcrições para expressão gênica de <i>ADAMTS-2</i> , <i>COL1A1</i> , <i>COL3A1</i> , <i>CD34</i> , <i>PTPRC/CD45</i> , <i>NT5E/CD73</i> , <i>THY1/CD90</i> .....	41
Tabela suplementar 3 – Resultados de qRT-PCR do gene <i>CD34</i> .....	43
Tabela suplementar 4 – Resultados de qRT-PCR do gene <i>PTPRC/CD45</i> .....	44
Tabela suplementar 5 – Resultados de qRT-PCR do gene <i>NT5E/CD73</i> .....	45
Tabela suplementar 6 – Resultados de qRT-PCR do gene <i>THY1/CD90</i> .....	46
Tabela 1a – Citometria de fluxo para reação cruzada de anticorpos em sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e CTM-TA de ovinos.....	49
Tabela 2a – Resumo dos resultados nos grupos experimentais, acerca da expressão gênica de <i>ADAMTS-2</i> , <i>COL1A1</i> e <i>COL3A1</i> , e das colorações especiais <i>Picrosirius red</i> e azul de toluidina.....	50

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1a – Animal com dermatosparaxia proveniente do experimento, aos 10 dias de vida, apresentando desprendimento de subcutâneo e aumento de volume em articulação femuro-tibio-patelar.....	04
Figura 2a – Representação esquemática da formação de fibra de colágeno normal e em pacientes com <i>dEDS</i> .....	06
Figura 1 – Caracterização das células tronco mesenquimais ovinas.....	37
Figura 2 – Comparação qualitativa sobre produção de colágeno nos três grupos experimentais.....	38
Figura 3 – Quantificações relativas de transcrições dos genes <i>COL1A1</i> , <i>COL3A1</i> e <i>ADAMTS-2</i> em células tronco mesenquimais ovinas.....	40

## LISTA DE ABREVIações

ADAMTS-2, 3 e 14 – metalopeptidase com trombospondina tipo 1 motif, 2, 3 e 14

BMP-1 – *Bone Morphogenetic Protein* – Proteína morfogenética óssea-1

CD – *Cluster of differentiation* – Cluster de diferenciação

cDNA – *complementary deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico complementar

COL1A1 – Colágeno tipo I alfa 1

COL3A1 – Colágeno tipo III alfa 1

CTM – Células tronco mesenquimais

*dEDS* – *dermatosparaxis Ehlers-Danlos Syndrome* – Síndrome de Ehlers-Danlos subtipo dermatosparaxia

DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12* - Meio mínimo modificado segundo Dulbecco

DPBS – *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* – Solução salina tamponada segundo Dulbecco

*EDS* – *Ehlers-Danlos syndrome* – Síndrome de Ehlers-Danlos

*g* – Força *g*

HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen – DR isotype* – Antígeno leucocitário humano – isotipo DR

ISCT – *International Society for Cell and Gene Therapy* – Sociedade Internacional para terapia celular e gênica

MO – Medula óssea

oCTM-TA – Células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo

P1, 2 e 3 – Passagem celular 1, 2 e 3

RNA – *ribonucleic acid* - ácido ribonucleico

RT-qPCR – *Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction* -  
Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase quantitativa

SFB – Soro fetal bovino

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SP – Sangue periférico

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Dermatosparaxia ovina e Síndrome de Ehlers-Danlos.....	4
Bioengenharia e modelos experimentais.....	7
Células tronco mesenquimais.....	8
OBJETIVOS.....	11
CAPÍTULO 2 - Trabalho Científico .....	12
Resumo .....	13
Introdução.....	14
Métodos .....	16
Resultados.....	23
Discussão .....	26
Conclusões .....	29
Referências.....	30
CAPÍTULO 3 .....	47
DISCUSSÃO GERAL.....	48
CONCLUSÃO GERAL.....	51
REFERÊNCIAS .....	51
Anexos.....	59

OLIVEIRA, J.P.M. **POTENCIAL DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO MODELO *IN VITRO* PARA A DERMATOSPARAXIA OVINA.** Botucatu, 2022. 75p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu.

## RESUMO

Dermatosparaxia ovina, doença autossômica recessiva, similar à Síndrome de Ehlers-Danlos subtipo dermatosparaxia, provoca fragilidade e hiperelasticidade da pele, resultado do polimorfismo de base única (SNP) c.421G>T exon 2 no gene *ADAMTS-2*, resultando na produção da enzima inativa responsável pela maturação do pró-colágeno I em fibrilas de colágeno tipo I e III. Células tronco mesenquimais (CTM) podem ser utilizadas em modelos *in vitro*, reproduzindo o que ocorre *in vivo*, minimizando o uso de modelos animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das CTM para o desenvolvimento de modelos *in vitro* de dermatosparaxia, pela avaliação qualitativa da produção de colágeno de CTM ovinas de tecido adiposo (CTM-TA) e da expressão gênica dos colágenos do tipo I e III, e *ADAMTS-2*. Os animais foram divididos em grupo dermatosparaxia (n=4); grupo heterozigoto (n=5) e grupo controle (n=5). As CTM-TA foram caracterizadas morfolologicamente, imunofenotipicamente e pela diferenciação *in vitro* em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica. Foi evidenciada diferença qualitativa quanto à deposição de colágeno em matriz extracelular de diferenciações condrogênicas, sendo ausente nos animais do grupo dermatosparaxia. A expressão gênica de *ADAMTS-2* foi menor no grupo dermatosparaxia, sendo que este último apresentou maior expressão de colágeno do tipo I, comparado ao grupo heterozigoto, explicada pela idade dos animais. A expressão média de colágeno do tipo III no grupo dermatosparaxia foi menor que no grupo *wild type*. Os resultados demonstram o potencial das CTM-TA de ovinos com dermatosparaxia no desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* da doença.

**Palavras-chave:** astenia cutânea, colágeno, expressão gênica, ovinos, síndrome de Ehlers-Danlos.

OLIVEIRA, J.P.M. **POTENTIAL OF OVINE MESENCHYMAL STEM CELLS AS AN *IN VITRO* MODEL FOR DERMATOSPARAXIS.** Botucatu, 2022. 75p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu.

## **ABSTRACT**

Ovine dermatosparaxis, autosomal recessive disease, similar to Ehlers-Danlos Syndrome subtype dermatosparaxis, culminates in fragility and hyperelasticity of the skin, caused by a single base polymorphism (SNP) c.421G>T exon 2 in ADAMTS-2 gene, resulting in inactive enzyme responsible for procollagen I maturation into type I and type III collagen fibrils. Mesenchymal stem cells (MSC) can be used as *in vitro* models, reproducing *in vivo* conditions, minimizing the use of animal models. The objective of this work was to evaluate the potential of MSCs for the development of *in vitro* models of dermatosparaxis, through the qualitative evaluation of collagen production of ovine AT-MSCs derived from adipose tissue and the gene expression of type I and III collagens and ADAMTS-2. The animals were divided into dermatosparaxis group (n=4); heterozygous group (n=5) and control group (n=5). AT-MSC were characterized morphologically, immunophenotypically and by *in vitro* differentiation into chondrogenic, adipogenic and osteogenic lineages. There was evidence of a qualitative difference in collagen deposition in the extracellular matrix of chondrogenic differentiation, which was absent in animals from the dermatosparaxis group. The gene expression of ADAMTS-2 was lower in the dermatosparaxis group, and the latter showed a higher expression of type I collagen, compared to the heterozygote group, explained by the age of the animals. The average expression of type III collagen in dermatosparaxis group was lower than in the wild type group. The results demonstrate the potential of sheep AT-MSCs with dermatosparaxis for the development of *in vitro* experimental models of the disease.

**Keywords:** collagen, cutaneous ashtenia, Ehlers-Danlos syndrome, gene expression, sheep.

# ***CAPÍTULO 1***

## INTRODUÇÃO

Dermatosparaxia, enfermidade encontrada em ovinos e em humanos, denominada *dermatosparaxis Ehlers-Danlos syndrome (dEDS* - síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo dermatosparaxia), doença autossômica recessiva, provocada por variante patogênica no gene *ADAMTS-2* por um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP c.421G>T, ovinos White Dorper) que codifica a N-propetidase *ADAMTS2*, responsável pela síntese das fibrilas de colágeno do tipo I e III, principalmente (ZHOU et al., 2012; ROBERTS e HALPER, 2021; MALFAIT et al., 2017).

Apesar de rara nos humanos, esta doença provoca sinais clínicos graves, onde fibras destes colágenos não são propriamente sintetizadas, culminando com extrema fragilidade da pele, tornando-se hiperelástica, fina e sensível, sendo facilmente rompida (BRADY et al., 2017). Nos ovinos, a condição se torna limitante para vida, pois inviabiliza a manutenção dos animais no rebanho. Ainda que os ovinos acometidos apresentem a mesma sintomatologia que a *dEDS*, seu uso com modelo experimental animal ainda não está estabelecido devido à dificuldade na confirmação molecular da doença (GOUVEIA et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2018; VROMAN et al., 2021).

Sendo assim, um modelo animal murino foi elaborado, porém não representa fielmente sua fisiopatologia, principalmente pelo fator idade-dependente, que não ocorre em casos naturais da enfermidade (LI et al., 2001; GOFF, et al. 2006; VROMAN et al., 2021).

Em paralelo, o estudo de doenças genéticas pode em muito se beneficiar do uso de células tronco mesenquimais (CTM) para o desenvolvimento de modelos *in vitro* devido à sua plasticidade (GUGJOO e AMARPAL, 2018). Através de uma pequena amostra de tecido de um paciente portador da enfermidade, é possível obter um grande volume de células com a mutação, permitindo seu uso em modelos experimentais que representam com mais fidelidade a biologia da condição, principalmente pela possibilidade de utilização em modelos tridimensionais, que podem mimetizar o comportamento *in vivo* em

um cultivo celular, evitando vieses encontrados em modelos animais manipulados (TARASSOLI et al., 2018; RAWAL et al., 2021; REN et al., 2021).

De acordo com *International Society for Cell and Gene Therapy* (ISCT), células tronco mesenquimais são células estromais não hematopoiéticas multipotentes encontradas em diversos tecidos adultos, como tecido adiposo, e que possuem alguns critérios para receber tal denominação, como aderência ao plástico, potencial de diferenciação *in vitro* e expressão de determinados marcadores de superfície (CHAMBERLAIN et al., 2007; GAO et al., 2016).

Diante da ausência de estudos envolvendo as células tronco mesenquimais de animais e/ou humanos acometidos por dermatosparaxia, a criação de modelos experimentais *in vitro* desta enfermidade a partir de CTM pode auxiliar no entendimento da doença *in vivo* e como meio de aprofundar os conhecimentos ao que tange a terapia desta condição.

Neste contexto este estudo visa desenvolver o primeiro passo na construção de um modelo experimental *in vitro* para dermatosparaxia, com potencial de pesquisa transversal para o estudo da síndrome de Ehlers-Danlos subtipo dermatosparaxia, a partir de células tronco mesenquimais ovinas portadoras da variante patogênica no gene *ADAMTS-2*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Dermatosparaxia ovina e Síndrome de Ehlers-Danlos*

Dermatosparaxia (*dermatosparaxis* de “tearing of the skin” - “rasgo da pele”) é uma doença autossômica recessiva, encontrada em animais e humanos, que pode ser denominada astenia cutânea ou cútis hiperelástica, tendo como principal característica acentuada fragilidade e capacidade de hiperextensão da pele, devido à produção da enzima ADAMTS2 (metalopeptidase com trombospondina tipo 1 motif, 2) inativa, responsável pela transformação do pró-colágeno tipo I em fibrilas de colágeno. Esta condição culmina com extrema facilidade em rompimento da pele, provocando feridas extensas, friáveis e de difícil cicatrização, além de sinais como desprendimento de subcutâneo e aumento de volume em articulações (Figura 1a) (LAPIÈRE et al, 1971; ZHOU et al., 2012; ANDRADE et al., 2014; ROBERTS e HALPER, 2021).

**Figura 1a** – Animal com dermatosparaxia proveniente do experimento, aos 13 dias de vida, apresentando desprendimento de subcutâneo e aumento de volume em articulação femuro-tibio-patelar.



Fonte: próprio autor.

Dados sobre a primeira descrição da doença não são totalmente estabelecidos, existem relatos de que a primeira identificação foi em cães, em 1947 (ROBERTS e HALPER, 2021), outros ainda citam os bovinos, em 1974 (HANSET e LAPIERE, 1974). A partir daí, foi diagnosticada em outras espécies

de animais domésticos, como gatos, equinos e nos ovinos (DUBAIL e APTE, 2015). Esta condição se torna limitante para vida nos animais de produção, pois inviabiliza que sejam mantidos no sistema de criação devido à severidade das lesões, sendo indicado eutanásia. Diante deste fato, a busca de animais heterozigotos nos rebanhos se faz necessária para controle e erradicação da doença nas criações (GOUVEIA et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2018).

A dermatosparaxia ovina está associada a dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). O primeiro, observado em ovinos da raça Dorper, é caracterizado pela substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) (c.421G>T) (ZHOU et al., 2012). E o segundo, descrito por Monteagudo e colaboradores em ovinos mestiços, também é caracterizado por uma substituição, de uma guanina (G) por uma adenina (A) (c.805G>A) (MONTEAGUDO et al., 2015).

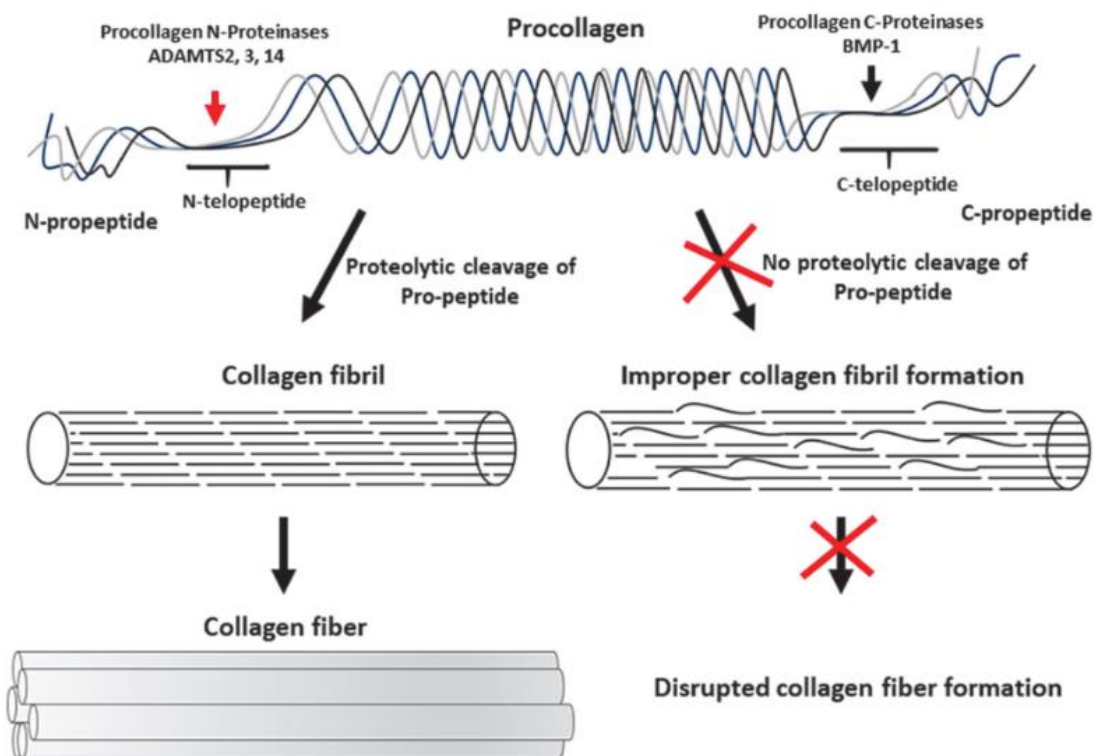
Nos humanos, condição semelhante é denominada *dermatosparaxis Ehlers-Danlos syndrome (dEDS* - síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo dermatosparaxia), pertencente ao grupo A: alterações na estrutura primária do colágeno e processamento do colágeno, anteriormente *EDS* tipo VIIC (MALFAIT et al., 2017), e que, adicionalmente aos sinais clínicos nos animais, podem ocorrer também relaxamento de articulações, hérnia umbilical, membros, pés e mãos curtos e retardo no crescimento (COLIGE et al., 1999; ANDRADE et al., 2014). A prevalência de *dEDS* é desconhecida, sendo classificada como uma das formas raras da *EDS* (BRADY et al., 2017).

A mais recente classificação internacional da Síndrome de Ehlers-Danlos reconhece 14 subtipos da doença com mutações em 20 genes diferentes que, de uma forma ou outra, estão envolvidos na biossíntese ou fibrilogênese de colágeno em diversos sistemas orgânicos, como sistema cardiovascular e musculoesquelético, dentre outros (VROMAN et al., 2021). As formas da doença que acometem genes de colágeno, como *EDS* clássica ou vascular, podem ainda assim, produzir fibras normais e alteradas ao mesmo tempo, ao passo que em casos de *dEDS*, toda fibrila de colágeno será alterada, resultando em casos graves (MALFAIT et al., 2017; SCHNELLMANN, 2022).

Tendo em vista que ossos, cartilagens, tendões e artérias também contêm fibras de colágeno, majoritariamente tipo I, II, III e V, processadas pela enzima ADAMTS2, acredita-se que a ausência de alterações nestas estruturas esteja relacionada à compensação por enzimas similares, ADAMTS3 e ADAMTS14, pois apresentam maior expressão nos tecidos supracitados (FERNANDES et al., 2001; COLIGE et al., 2002; DUBAIL e APTE, 2015).

Para formação das moléculas de colágeno tipo I, III e V, predominantes na derme e que garantem a tensão normal da pele, além da ação da ADAMTS2 na clivagem do N-propeptídeo, é necessário também que ocorra a clivagem do C-propeptídeo pela proteína *Bone Morphogenetic Protein - 1* (BMP-1), de modo que as fibrilas normais possam ser arranjadas em fibras de colágenos ordenadas (Figura 2a) (VROMAM et al., 2021; SCHNELLMANN, 2022).

**Figura 2a** - Representação esquemática da formação de fibra de colágeno normal e em pacientes com *dEDS*. Adaptado de SCHNELLMANN, 2022.



O aparecimento dos sinais clínicos está condicionado aos humanos, bovinos e ovinos homozigotos recessivos, onde há uma variante patogênica no gene *ADAMTS-2*. A geração da enzima ADAMTS2 inativa culmina com a

formação de fibrilas de colágeno inadequadas, que são prejudiciais à síntese das fibras de colágeno (ZHOU et al., 2012).

Dentre as 20 mutações que ocorrem na *EDS*, existem 14 modelos experimentais animais projetados, sendo eles camundongos e *zebrafish*, que mimetizam o fenótipo da doença nos humanos (DUBAIL e APTE, 2015; VROMAN et al., 2021). Um modelo experimental murino *knockout* homocigoto foi desenvolvido para mutação no gene *ADAMTS-2* (*ADAMTS2<sup>-/-</sup>*), no entanto as alterações cutâneas mimetizadas por estes animais são idade-dependente, tendo o início das alterações cutâneas por volta dos dois meses de idade, diferentemente do que é reportado em humanos e animais naturalmente doentes (LI et al., 2001; GOFF et al., 2006). Apesar da *dEDS* também ocorrer naturalmente nos ovinos, estes animais não são utilizados como modelos experimentais da doença devido à dificuldade na comprovação molecular da condição (VROMAN et al., 2021).

### *Bioengenharia e modelos experimentais*

Dentre as técnicas de engenharia tecidual, a bioimpressão tridimensional (3D), constitui um enorme avanço para o desenvolvimento de pesquisas *in vitro* nos últimos anos. Sua utilização explora mais fielmente modelos experimentais por mimetizar tecidos *in vivo*, chamados organóides (*tissue-like*), reproduzindo resultados mais próximos à realidade (KENGLA et al., 2015; RAWAL et al., 2020; REN et al., 2021).

A técnica de bioimpressão 3D consiste na utilização de uma biotinta, composta por células, fatores tróficos e/ou biomateriais, impressos através de orientação computacional, de modo que os componentes possam ser posicionados da forma desejada dentro de uma matriz (JIAN et al., 2018).

Além da utilização como plataformas experimentais, a bioimpressão pode originar implantes aplicados em terapia, como no tratamento de feridas, utilizando *scaffolds* impressos com células tronco mesenquimais como auxílio na reparação de feridas crônicas (KENGLA et al., 2015; TARASSOLI et al., 2018).

O uso das células tronco mesenquimais traz benefícios também no desenvolvimento de modelos experimentais 3D, pois permite a utilização de células oriundas de pacientes que possuem doenças genéticas, de forma a replicar sua biologia em um cultivo celular, além de ser uma fonte ilimitada de células indiferenciadas e com potencial de auto renovação (ONG et al., 2017; TARASSOLI et al., 2018).

Estudos utilizando CTM em bioimpressão 3D de derme demonstraram que, além da vantagem de possuírem multipontência, podendo gerar outras linhagens celulares, as CTM na cicatrização de feridas apresentam resultados melhores que outras linhagens celulares devido ao seu poder imunomodulatório e regenerativo (ONG et al., 2017; AUGUSTINE, 2018; PHUA et al., 2021). Estes fatores justificam sua utilização em modelos *in vitro*, por reproduzirem com mais semelhança as características do tecido alvo.

Na medicina humana, o uso de organóides se mostra um modelo experimental mais fiel do que os modelos experimentais animais, por permitir a utilização de células tronco pluripotentes (PSC), ou de pluripotência induzida (iPSC), ou células tronco mesenquimais adultas, de fácil obtenção e que evitam o aparecimento de vieses em modelos animais (SALARIS e ROSA, 2019; RAWAL et al., 2021; REN et al., 2021).

### *Células tronco mesenquimais*

Células tronco mesenquimais (CTM) são células estromais, não hematopoiéticas multipotentes, capazes de se diferenciar em diversas linhagens teciduais *in vitro*, de acordo com o meio de cultivo ao qual são expostas, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos (POUNTOS e GIANNOUDIS, 2005; GAO et al., 2016).

De acordo com a capacidade de diferenciação, da maior para menor, as células podem ser classificadas em totipotentes, células do zigoto; pluripotentes encontras no trofoblasto e; multipotentes, oligopotentes e unipotentes que são linhagens de células obtidas em tecidos adultos (GUGJOO e AMARPAL, 2018).

Segundo a *International Society for Cell and Gene Therapy* (ISCT), os quesitos para que as células sejam consideradas células tronco multipotentes

são: adesão ao plástico quando cultivadas, capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, quando submetidas a meios de cultivo específicos, e expressão de antígenos específicos, positivos CD73, CD 90 e CD105 e negativos CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  e *Human Leucocyte Antigen* (HLA) de classe II (DOMINICI et al., 2006; CHAMBERLAIN et al., 2007).

Seu uso tem sido cada vez mais investigado na medicina humana e veterinária, tendo em vista os efeitos benéficos em inúmeras afecções por sua plasticidade, capacidade de proliferação, produção de fatores tróficos, efeito anti-inflamatório e imunomodulador. Neste contexto a aplicação da terapia celular se torna viável em algumas enfermidades, como lesões de nervos periféricos, de cartilagem articular e osteomusculares, quadros de síndrome inflamatória sistêmica e na cicatrização de feridas, por meio de sinalização parácrina, auxiliando no processo de regeneração do tecido, evitando fibrose (CERQUEIRA et al., 2012; GUGJOO e AMARPAL, 2018; DEHKORDI et al., 2019).

São vários os mecanismos de ação das células tronco mesenquimais, como seu efeito parácrino, produzindo fatores tróficos, citocinas e quimiocinas e proteínas imunomodulatórias, estimulando neovascularização, diminuindo hipoxia tecidual e apoptose celular, além de seu efeito antioxidante e recrutamento de células tronco presentes no tecido lesado (GNECCHI et al., 2006; STEWART e STEWART, 2011). Outros mecanismos de ação produzidos pelas CTM incluem a fusão celular, onde há a formação de células multinucleares, transferência mitocondrial possibilitada pela formação de um *gap* quando há contato entre uma CTM e uma célula do tecido alvo ou liberação de microvesículas contendo RNA e/ou proteínas, que serão captadas pelas células do tecido lesado (LIANG et al., 2014).

A produção de CTM de ovinos (oCTM), assim como de outras espécies, pode ser obtida através do processamento de medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, líquido amniótico, cotilédones, endométrio e sangue periférico, tendo suas características individuais para escolha da origem a ser utilizada.

O tecido adiposo apresenta uma boa fonte de obtenção de CTM devido à facilidade de acesso para colheita, facilidade em isolar o estroma, o que o torna

fonte de grande quantidade de células tronco multipotentes, além de apresentar alto crescimento *in vitro* (ZUK et al., 2002; BARBERINI et al., 2014; GUGJOO e AMARPAL, 2018). Nos ovinos, o tecido adiposo pode ser acessado em órgãos intra-abdominais ou no subcutâneo, este último como método pouco cruento e menos laborioso (HEIDARI et al., 2013; BARBERINI et al., 2014).

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das células tronco mesenquimais ovinas derivadas do tecido adiposo para o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de dermatosparaxia, por meio da avaliação qualitativa da produção de colágeno e da expressão gênica do gene *ADAMTS-2*, dos colágenos do tipo I e III derivadas de animais naturalmente acometidos pela dermatosparaxia ovina.

## ***CAPÍTULO 2 - Trabalho Científico***

Trabalho a ser enviado à revista científica *Stem Cell Research & Therapy*

Normas para publicação na revista:

<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript>

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E DERMATOSPARAXIA OVINA:  
CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE MODELOS *IN VITRO*

**MESENCHYMAL STEM CELLS AND OVINE DERMATOSPARAXIS:  
CHARACTERIZATION AND POTENTIAL AS AN *IN VITRO* MODEL**

### Resumo

**Introdução:** Dermatosparaxia ovina, doença autossômica recessiva, similar a Síndrome de Ehlers-Danlos subtipo dermatosparaxia, culmina em fragilidade e hiperelasticidade da pele, pela variante patogênica no gene *ADAMTS-2*, por um polimorfismo de base única (SNP) c.421G>T no exon 2 (ovinos White Dorper) e produção da enzima inativa responsável pela maturação do pró-colágeno I em fibrilas de colágeno tipo I e III. Células tronco mesenquimais (CTM) podem ser utilizadas como modelos *in vitro* de doenças genéticas, representando com mais acurácia o que ocorre *in vivo*, minimizando o uso de modelos animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das CTM para o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de dermatosparaxia, por meio da avaliação qualitativa da produção de colágeno e da expressão gênica do gene *ADAMTS-2* e dos colágenos do tipo I e III e de CTM derivadas de tecido adiposo de ovinos provenientes de três grupos experimentais.

**Métodos:** As células tronco mesenquimais foram isoladas do tecido adiposo ovino, cultivadas até a terceira passagem e caracterizadas morfológica e imunofenotipicamente e pelo potencial de diferenciação *in vitro* em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica. Para avaliação qualitativa de deposição de colágeno, as amostras de diferenciação condrogênica foram coradas com azul de toluidina e vermelho Picrosirius. Já para expressão gênica,  $2 \times 10^5$  células foram lisadas com Trizol para extração do RNA e posterior síntese de cDNA para análise de RT-qPCR.

**Resultados:** A deposição de colágeno em matriz extracelular nas amostras dos animais do grupo dermatosparaxia não foi identificada, enquanto nos demais grupos estava evidente. Amostras dos animais doentes apresentaram expressão gênica de *ADAMTS-2* cerca de 17 e 19 vezes menor que nos grupos GH e GW, respectivamente. A expressão gênica do colágeno do tipo I foi maior no grupo dermatosparaxia, comparado ao grupo heterozigoto, ambos sem diferença

estatística do grupo *wild type*. A expressão média de colágeno do tipo III no grupo dermatosparaxia foi menor que no grupo controle.

**Discussão:** A ausência da deposição de colágeno na matriz extracelular do grupo acometido, tendo em vista que a variante patogênica impede a produção de colágeno do tipo I e III, pode indicar o potencial das células tronco na reprodução *in vitro* da doença. Os resultados de expressão gênica de *ADAMTS-2* são similares ao encontrado na literatura sobre *dEDS* e dermatosparaxia ovina. Já os resultados obtidos nos genes de colágeno tipo I podem ser explicados pela idade dos animais do grupo dermatosparaxia, que não ultrapassou 10 dias, enquanto a média no grupo heterozigoto foi de 38,2 meses.

**Conclusão:** Tendo em vista que a variante patogênica age na produção da N-proteptidase *ADAMTS2*, os resultados obtidos demonstram o potencial das CTM derivadas do tecido adiposo de ovinos com dermatosparaxia no desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* da doença.

**Palavras-chave:** colágeno, expressão gênica, ovinos, síndrome de Ehlers-Danlos.

## Introdução

Dermatosparaxia ovina, doença autossômica recessiva, onde há uma variante patogênica no gene *ADAMTS-2* por um polimorfismo de base única (SNP) c.421G>T no exon 2 (ovinos White Dorper) ou c.805G>A, exon 4 (animais mestiços), culmina com a produção da enzima *ADAMTS2* inativa, responsável pela clivagem no N-propetideo terminal do pró-colágeno tipo I, transformando-o em fibrilas de colágeno tipo I, III e V [1,2,3]. As fibras formadas a partir destas fibrilas estão fortemente presentes na pele, o que provoca sinais clínicos de hiperextensibilidade e intensa fragilidade da pele, provocando facilmente feridas extensas e de difícil cicatrização, tornando a dermatosparaxia limitante para vida em ovinos [4].

Doença similar ocorre em humanos, denominada síndrome de Ehlers-Danlos subtipo dermatosparaxia (*dEDS*), que apesar de rara, provoca sinais clínicos

similares aos ovinos acometidos, culminando em quadros com abordagens terapêuticas limitadas, principalmente pela dificuldade na execução de testes pré-clínicos devido à baixa prevalência em humanos, por ser uma doença rara, e ausência de modelos animais específicos, sendo que o modelo murino *knockout* possui fator idade dependente, onde os sinais clínicos se iniciam por volta dos dois meses de idade [3,5].

A busca pelo uso das células tronco mesenquimais no desenvolvimento de modelos experimentais é justificada pela capacidade de reproduzir as características clínicas de uma doença *in vitro*, do modo mais fiel à sua fisiopatologia, como nas doenças de caráter genético. A partir de uma pequena amostra, é possível obter grandes quantidades de células tronco mesenquimais que podem se diferenciar em diversos tipos celulares quando induzidas, produzindo modelos fiéis à enfermidade [6,7].

As células tronco mesenquimais são células não hematopoiéticas, indiferenciadas e com potencial de diferenciação que varia de acordo com sua origem. Seu uso terapêutico tem sido empregado nas últimas décadas com resultados satisfatórios para o tratamento de diversas doenças por seus inúmeros potenciais regenerativos e imunomodulatórios. Além disso, têm sido empregadas no desenvolvimento de modelos experimentais por sua plasticidade e capacidade de originar diversos tipos celulares [8,9,10].

Tendo em vista a similaridade das doenças e a possibilidade do uso das CTM em modelos experimentais, o objetivo deste trabalho foi caracterizar células tronco mesenquimais de ovinos de tecido adiposo (oCTM-TA) portadores da variante patogênica no gene *ADAMTS-2* SNP c.421G>T, e identificar seu

potencial na criação de modelos experimentais, que possibilitem avanços na pesquisa de terapias para a doença, por meio da avaliação da produção de colágeno das oCTM diferenciadas.

## **Métodos**

### **Colheita de tecido adiposo**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ - UNESP, sob o número de protocolo 0148/2021. Foram selecionados 14 ovinos mestiços White Dorper previamente testados para variante patogênica no gene *ADAMTS-2* c.421G>T, segundo metodologia descrita por Andrade e colaboradores (2016) [29], sendo 10 fêmeas e quatro machos, de diferentes idades, divididos em três grupos experimentais: grupo dermatosparaxia (GD; n=4), grupo heterozigoto (GH; n=5) e grupo *wild type* ou controle (GW; n=5), com médias de idades de nove dias, 38,2 meses e 18 meses, respectivamente. Os animais foram provenientes do rebanho do setor de Clínica de Grandes Animais da FMVZ - UNESP.

Os animais foram mantidos em baias coletivas, recebendo feno e água *ad libitum* e ração comercial duas vezes ao dia.

As amostras de tecido adiposo foram colhidas do subcutâneo na região paravertebral lombar [11], por meio de uma incisão de aproximadamente três centímetros, após sedação e bloqueio anestésico local nos grupos GH e GW.

No grupo GD, a coleta ocorreu entre a primeira e segunda semana de vida, imediatamente após a eutanásia dos animais pelo método químico (Xilazina,

Tiopental e Cloreto de Potássio), seguindo normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV, devido à gravidade da enfermidade, sendo incompatível com a manutenção dos animais no rebanho.

As amostras foram acondicionadas em meio de transporte contendo DPBS (Nova Biotecnologia, Brasil), 3% de penicilina/estreptomicina (Nova Biotecnologia, Brasil) e 0,5% de anfotericina B (Nova Biotecnologia, Brasil) até a finalização das coletas e preparação da bancada para processamento das amostras.

### **Isolamento e cultivo das oCTM-TA**

Em bancada de fluxo laminar, as amostras foram colocadas em placas de Petri e pesadas, lavadas três vezes e posteriormente separadas mecanicamente em fragmentos de 0,2 a 0,3 cm. Em seguida as amostras já fragmentadas foram submetidas à digestão enzimática em solução de 2 mg/ml de colagenase tipo 1 (ThermoFisher Scientific, EUA) em meio DMEM/F12 (Nova Biotecnologia, Brasil) puro, por quatro horas a 37,5°C, sendo utilizado 4 mg de colagenase por grama de amostra. Após a digestão, foi utilizado meio de cultura (90% DMEM/F12 + 10% SFB + 1% penicilina/estreptomicina + 0,5% anfotericina B) para inativação da colagenase, e procedida a filtragem em filtros de 70 µm. Os tubos foram então centrifugados duas vezes a 300 g por 10 minutos, sendo desprezado o sobrenadante e ressuspendido em meio completo. O *pellet* formado foi cultivado em dois frascos T25 (25cm<sup>2</sup>) (Kasvi, Brasil) com meio de cultura, a 37,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em câmara úmida, tendo o meio de cultura trocado a cada três dias,

acompanhando diariamente o desenvolvimento do cultivo por meio da observação de células aderentes em microscópio de luz invertida (Leica Microsystems, EUA).

Ao atingir 80% de confluência, o meio de cultura foi desprezado, as garrafas lavadas com DPBS e procedeu-se o destacamento das células aderentes utilizando tripsina 0,25% (Nova Biotecnologia, Brasil) a 37,5°C por cinco minutos, com subsequente inativação com meio de cultura. A solução formada foi acondicionada em tubos de 15 ml e centrifugadas a 300 g por 10 minutos para formação do *pellet* de células.

O *pellet* foi ressuspenso em 10ml de DPBS e uma alíquota retirada para contagem em câmara de Neubauer. A partir da concentração obtida, utilizou-se cerca de 5 a  $10 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> para semeadura em garrafas T75 (75cm<sup>2</sup>) (Kasvi, Brasil) para formação de passagem 1 (P1), sendo incubadas com meio de cultura a 37,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em câmara úmida, procedendo a troca meio de cultura a cada três dias, até a obtenção de 80% de confluência.

As amostras foram expandidas até a passagem 3, momento em que foram separadas para caracterização das linhagens e utilização nos experimentos, através da técnica descrita no parágrafo anterior, com exceção de que para as amostras em P2 e P3 optou-se por garrafas T175 (175cm<sup>2</sup>) (Kasvi, Brasil), de modo a obter maior volume de células.

Todas as análises executadas neste trabalho utilizaram oCTM-TA à passagem 3, após obtenção da viabilidade celular pela técnica de azul de Trypan.

## **Caracterização das oCTM-TA**

### ***Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica***

Para as diferenciações adipogênica e osteogênica, as células foram semeadas com meio de cultura utilizado para expansão em placas de 24 poços (Kasvi, Brasil) utilizando uma densidade de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> em triplicatas e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem 60% de confluência, o meio de cultura foi desprezado e substituído pelo meio de diferenciação (90% meio basal + 10% suplemento) StemPro adipogênese e StemPro osteogênese (InvitroGen, EUA), trocado a cada 72h, por 21 e 14 dias, respectivamente, segundo recomendações do fabricante.

Para avaliação da diferenciação adipogênica o meio de indução foi retirado e os poços fixados com paraformaldeído tamponado a 4% por 20 minutos a 4°C para posterior coloração com Oil Red O 60% (pH 4,2; Sigma-Aldrich Corp., EUA) por cinco minutos, em água destilada, a partir de uma solução estoque a 0,5% em isopropanol, sendo visualizadas inclusões lipídicas citoplasmáticas. A diferenciação osteogênica foi avaliada após retirada do meio de indução, fixação dos poços com paraformaldeído tamponado 4% por 30 minutos em temperatura ambiente e coloração com vermelho de alizarina S 2% (pH 4,5; Sigma-Aldrich Corp., EUA) em água destilada por três minutos, a confirmação da diferenciação se deu pela visualização da deposição de matriz extracelular de cálcio.

Para diferenciação condrogênica, foram utilizadas  $3 \times 10^6$  células, em triplicatas, colocadas em tubos de 15 ml e centrifugadas a 300 g por 10 minutos, para formação de *pellet*, incubado à 37,5°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, com meio de cultura. Após quatro dias, o meio de cultura foi substituído pelo

meio de indução (90% meio basal + 10% suplemento) StemPro condrogênese (InvitroGen, EUA), trocado a cada 72h, por 21 dias, segundo recomendações do fabricante. Para confirmar a diferenciação, ao fim do período de indução o meio foi desprezado e substituído por formol tamponado 10% e a micromassa, incluída em blocos de parafina para elaboração das lâminas histológicas e coloração com azul de toluidina, para visualização da deposição de matriz extracelular de cartilagem.

### ***Citometria de fluxo***

Foram utilizadas cerca de  $1 \times 10^5$  células (100 $\mu$ l de uma solução de  $1 \times 10^6$  células por mL), incubadas com os anticorpos conjugados *mouse anti-human* CD14 APC (BD Biosciences; Clone M5E2) e *mouse anti-human* CD29 APC (eBioscience; Clone TS2/16), segundo recomendações do fabricante, por 30 minutos, exceto os controles de autofluorescência, e, após, analisadas em citometro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences), sendo adquiridos 30.000 eventos por amostra.

### ***Expressão gênica***

Foram selecionados quatro genes para caracterização de células tronco mesenquimais ovinas utilizando a técnica de RT-qPCR, sendo eles, *cluster of differentiation 34 (CD34)*, *protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC - CD45)*, *5'-nucleotidase ecto (NT5E - CD73)* e *Thy-1 cell surface antigen (THY-1 - CD90)*. Além disso, foram utilizados seis genes normalizadores, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *beta actin (ACTB)*, *beta-*

*2-microglobulin (B2M), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), ribosomal protein 5 e ribosomal protein 19 (RPS5 e RPS19).*

A técnica encontra-se descrita abaixo, na seção “RT-qPCR”.

### **Análise de deposição de matriz extracelular**

Os cortes histológicos das micromassas de diferenciação condrogênica foram corados com vermelho Picrossirius, além do azul de toluidina, e submetidos à microscopia óptica para fotodocumentação e comparação entre os grupos quanto à deposição de matriz extracelular de colágeno e proteoglicanos.

### **RT-qPCR**

Cerca de  $2 \times 10^5$  de oCTM-TA não diferenciadas dos três grupos foram acondicionadas em microtubos de 2ml, em duplicatas, e centrifugadas a 300 g por 10 minutos para obtenção do *pellet* de células. O RNA total foi obtido pela técnica *phenol-chlorophorm* (TRIzol, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brasil), segundo recomendações do fabricante. O RNA foi eluído com água livre de RNA e quantificado por meio de espectrofotometria em Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA). As alíquotas obtidas foram tratadas com DNase para remoção de traços de DNA.

Para síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados 1000 nanogramas de RNA total, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, e a transcrição reversa com termociclador *Veriti*

96 well (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). As condições de termociclagem foram: 10 minutos a 25°C, 12 minutos a 37°C e cinco minutos a 85°C.

As análises foram executadas em duplicatas a partir do cDNA produzido, *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), água livre de RNA e os primers apresentados no quadro 1, obtidos através do software Primer Express v3.0.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Foram selecionados os genes alvo *ADAMTS-2*, colágeno tipo I alfa 1 (*COL1A1*) e colágeno tipo III alfa 1 (*COL3A1*). Além disso, foram utilizados seis genes normalizadores, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *beta actin (ACTB)*, *beta-2-microglobulin (B2M)*, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)*, *ribosomal protein 5* e *ribosomal protein 19 (RPS5 e RPS19)*.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), nas condições de 50°C por dois minutos, 95°C por dois minutos e 40 ciclos de 95°C por um segundo e 60°C por 30 minutos. A quantificação relativa da expressão dos genes alvo foi obtida pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [12], utilizando as médias dos genes normalizadores.

## **Análise estatística**

Os resultados obtidos por RT-qPCR, em quantidade relativa ( $QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), foram comparados entre os três grupos para cada gene, observando a normalidade, a média e o valor mínimo e o valor máximo e então aplicado o teste de Tukey.

## **Resultados**

### **Colheita e cultivo de oCTM-TA**

As lesões cutâneas da dermatosparaxia não permitem sua manutenção no rebanho além dos primeiros dias de vida, e ainda pela necessidade dos cruzamentos entre heterozigotos, dentro de um rebanho limitado em matrizes, houve uma grande diferença na idade, principalmente quando comparamos o grupo dermatosparaxia com os demais. A média de idade do GD foi de nove dias, enquanto do GH foi de 38 meses e do GW, 17 meses.

Os ovinos homozigotos recessivos (GD) apresentavam pele extremamente frágil, com aparecimento de feridas laceradas logo nos primeiros dias de vida, além de desprendimento do subcutâneo em articulações e região de peito, sendo evidente a facilidade no rompimento da pele após a eutanasia, durante o procedimento de coleta.

Das 14 amostras coletadas, uma delas apresentou contaminação bacteriana no segundo dia após o isolamento, e por se tratar de um dos animais do GD, submetido à eutanasia antes do procedimento, não foi possível repetir este isolamento.

Após processamento das amostras, em cultivo, as colônias apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, produzindo linhagens que atingiam confluência após, em média, sete dias. Além de apresentarem viabilidade acima de 97% (Tabela suplementar 1).

### **Caracterização das oCTM-TA**

As populações celulares apresentaram características de células tronco mesenquimais, sendo aderentes ao plástico, morfologia fibroblastóide e diferenciação nas três linhagens celulares, adipogênica, osteogênica e condrogênica quando estimuladas *in vitro* e expressão do marcador de superfície CD29 e ausência de expressão do marcador CD14, pela técnica de citometria de fluxo (Figura 1).

A média de expressão do marcador CD14 foi de 1,01%, sendo assim, considerado negativo, e para o CD29 foi de 98,15%, considerado positivo.

Sobre a expressão gênica dos genes CD34, CD45, CD73 e CD90, todos apresentaram expressão, sendo que CD45 e CD90 não apresentaram diferença estatística quanto ao QR e, apesar da expressão estar presente, os genes CD34 e CD45 apresentaram valores de  $\Delta$ CT altos (médias  $\Delta$ CT 11,047 e 14,275, respectivamente) quando comparados aos genes CD73 e CD90 (médias  $\Delta$ CT 2,417 e 1,738, respectivamente). Os dados estão apresentados nas tabelas suplementares 2, 3, 4, 5 e 6.

### **Análise morfológica**

Os cortes histológicos das micromassas produzidas para a diferenciação condrogênica das linhagens celulares foram analisadas por meio de microscopia óptica. No grupo GD, não houve deposição de matriz extracelular de colágeno, evidente nas colorações de azul de toluidina e vermelho Picrosirius. Enquanto nos grupos GH e GW foram visualizados pontos de depósito de matriz extracelular, onde há coloração das fibras de colágeno nas duas técnicas (Figura 2).

### **Expressão gênica: *ADAMTS-2*, colágeno tipo I e colágeno tipo III**

Os resultados obtidos foram comparados a partir da quantidade relativa de transcrição em relação à média dos genes normalizadores, sendo assim, quando analisada a expressão do gene *ADAMTS-2*, as CTM dos animais do grupo GD apresentaram expressão 17 e 19 vezes menor que GH e GW, respectivamente, sendo GH e GW estatisticamente iguais entre si e diferentes de GD ( $P < 0,05$ ). Já colágeno tipo I alfa 1, entre os três grupos, houve diferença estatística entre o grupo GD e GH ( $P < 0,05$ ), onde GD foi cerca de 1,65 vezes maior que GH, sendo que não houve diferença do GW quando comparado aos demais. Já na análise do colágeno do tipo III alfa 1, a diferença estatística esteve presente entre os grupos GW e GD ( $P < 0,05$ ), sendo GW cerca de 2,25 vezes maior que GD e neste caso o GH não apresentou diferença estatística em relação ao GW e GD. Os resultados estão apresentados na Figura 3 e Tabela suplementar 2.

## **Discussão**

A partir dos resultados, as células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo, provenientes de animais portadores de uma variante patogênica no gene *ADAMTS-2*, demonstram possibilitar sua utilização no desenvolvimento de modelos *in vitro* da dermatosparaxia, evidenciada pela ausência da deposição de colágeno em matriz extracelular quando induzidas em diferenciação condrogênica.

Todavia a obtenção dos resultados foi afetada por algumas limitações, como a quantificação de colágeno produzido nas amostras de diferenciação condrogênica e a idade heterogênea dos animais nos grupos experimentais, com animais com até nove dias de vida no grupo dermatosparaxia e animais com idades superiores a 17 e 30 meses nos grupos GH e GW, respectivamente. Este fator afetou diretamente os resultados obtidos por RT-qPCR.

Acerca do local de colheita de tecido adiposo, nos ovinos a deposição de gordura ocorre principalmente sobre órgãos abdominais, como a gordura perirenal, o que pode dificultar sua obtenção quando utilizamos pontos como a base da cauda, muito utilizada em equinos. Para os ovinos, pode-se utilizar amostras obtidas da gordura infrapatelar, intra-abdominal (como a perirenal) ou do subcutâneo [11,13,14,15], sendo a região paravertebral lombar tão satisfatória quanto as demais, pois além das vantagens encontradas nas outras técnicas, os ovinos tendem a depositar mais gordura nesta região, permitindo obtenção de volumes de amostra satisfatório, além de diminuir o risco de contaminação do local da ferida cirúrgica, quando comparada à base da cauda, pela proximidade com a região perianal [11,13,14].

As células obtidas dos três grupos apresentaram características de células tronco mesenquimais, como adesão ao plástico, expansão clonal e morfologia fibroblastóide, como encontrado em pesquisas utilizando células tronco mesenquimais ovinas [16,17].

Considerando os requisitos mínimos estabelecidos pela *ISCT* para caracterização das células tronco mesenquimais humanas, as amostras submetidas aos meios de indução à diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica apresentaram deposição de lipídeos, proteoglicanos e cálcio, respectivamente, comprovando a origem das células tronco, como observado em linhagens, além de tecido adiposo, de medula óssea, sangue periférico e fígado [11,17,18].

A análise de marcadores de superfície *Clusters of Differentiation* (CD) pode ser empregada pelas técnicas de citometria de fluxo e RT-qPCR, nas quais, para oCTM-TA, podem ser testados CD14<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>. Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com dados da literatura, tendo apresentado média de positividade de 1,01% para CD14 (negativo) e 98,15% para CD29 (positivo), por meio da técnica de citometria de fluxo [16,19,20,21,22].

A aplicação da RT-qPCR para caracterização de marcadores de superfície obteve expressão dos quatro marcadores testados, no entanto quando observamos os valores de  $\Delta$ CT (*threshold cycle* – ciclos de amplificação normalizados), os genes CD34 e PTPRC (CD45) apresentam  $\Delta$ CT altos, sendo caracterizados como genes tardios, ou seja, quando há quantidades muito baixas de RNA/DNA na amostra, podendo ser considerados negativos, enquanto

NT5E (CD73) e THY1 (CD90) apresentam  $\Delta$ CT baixos (Tabelas suplementares 3, 4, 5 e 6) [23]. Resultados similares foram encontrados em um estudo que caracterizou células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo e medula óssea [17].

Assim como demonstrado em nosso estudo, a utilização da coloração de vermelho de Picrosirius possibilitou a identificação de colágenos do tipo I e II, depositados em matriz extracelular, visualizado em micromassas de diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais [24,25]. Estes resultados também foram encontrados em cultivo de fibroblastos de derme [26]. Tendo em vista que a dermatosparaxia impede a produção de colágeno do tipo I, a ausência da coloração no grupo GD e presença nos grupos GH e GW, podem indicar que as células tronco mesenquimais têm potencial de reproduzir algumas características da doença *in vitro*.

Os colágenos do tipo I e III são os afetados na dermatosparaxia, justificando a escolha dos mesmos para testes de expressão gênica, juntamente com o gene *ADAMTS-2* [27]. A redução acentuada da expressão do gene *ADAMTS-2* esteve presente nos animais portadores da variante patogênica, assim como em estudos com humanos portadores de *dEDS* [28].

Em ovinos a doença foi diagnosticada por meio das técnicas de PCR-SSP [4], PCR-RFLP [29], sequenciamento direto de Sanger [30] e TETRA-ARMS PCR [31].

O aumento na expressão gênica de COL1A1 no grupo GD, comparado ao grupo GH, pode ser explicada pela diferença de idade, principalmente entre esses grupos, pois sua expressão tende a diminuir com a idade, como demonstrado

em modelos *in vitro* por estresse oxidativo ou irradiação ultravioleta B, em cultivo de fibroblastos [32,33]. Diferentemente do encontrado, esperava-se que a expressão de COL3A1 fosse similar a de COL1A1, devido aos efeitos da idade na expressão gênica e concentração de colágeno do tipo III nos tecidos [34].

## **Conclusões**

Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de ovinos portadores de dermatosparaxia podem ser empregadas no desenvolvimento de modelos *in vitro* da doença, tendo em vista que os resultados obtidos demonstraram menor deposição de colágeno *in vitro* destas células.

Ainda, devido às diferenças entre o modelo experimental murino e a *dEDS*, os ovinos, por apresentarem as mesmas características clínicas que humanos acometidos, podem representar uma alternativa mais fiel no desenvolvimento de plataformas experimentais da doença.

Mais estudos acerca do comportamento destas células em cultivos tridimensionais, se fazem necessários para aprofundar a confirmação das oCTM-TA na aplicação de modelos *in vitro*.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## **Financiamento**

Esta pesquisa foi desenvolvida com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Referências**

1. Andrade DGA, Pavan LF, Amorim RM, Chiacchio SB, Laufer-Amorim R, Gonçalves RC, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34:443-448.
2. Vroman R, Malfait AM, Miller RE, Malfait F, Syx D. Animal models of Ehlers–Danlos syndromes: phenotype, pathogenesis, and translational potential. *Frontiers in genetics*. 2021;12:1-29.
3. Schnellmann, R. Advances in ADAMTS biomarkers. *Advances in Clinical Chemistry*, p. 1, 2022.
4. Zhou H, Hickford JG, Fang Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. *Animal genetics*. 2012;43(4):471-473.
5. Malfait F, Francomano C, Byers P, Belmont J, Berglund B, Black J, ... Tinkle B. The 2017 international classification of the Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2017;175(1):8-26.

6. Ong CS, Yesantharao P, Huang CY, Mattson G, Boktor J, Fukunishi T, Zhang H, Hibino N. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric research*. 2017;83(1):223-231.
7. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, Whitaker IS. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2018;71(5):615-623.
8. Gnechi M, He H, Noiseux N, Liang, OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *The FASEB Journal*. 2006;20(6):661-669.
9. Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 2011;27(2):243-261.
10. Gugjoo MB, Amarpal. Mesenchymal stem cell research in sheep: Current status and future prospects. *Small Ruminant Research*. 2018;169:46-56.
11. Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, Sarvari A, Borjian, S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2013;5(2):104.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

13. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(13):3572-3579.
14. Fadel L, Viana BR, Feitosa MLT, Ercolin ACM, Roballo KCS, Casals JB, Pieri NCG, Meirelles FV, Martins DS, Miglino MA, Ambrósio CE. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta cirurgica brasileira*. 2011;26:267-273.
15. Vahedi P, Soleimanirad J, Roshangar L, Shafaei H, Jarolmasjed S, Charoudeh HN. Advantages of sheep infrapatellar fat pad adipose tissue derived stem cells in tissue engineering. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2016;6(1):105.
16. Haddouti EM, Randau TM, Hilgers C, Masson W, Walgenbach KJ, Pflugmacher R, Burger C, Gravius S, Schildberg FA. Characterization and comparison of human and ovine mesenchymal stromal cells from three corresponding sources. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2310.
17. Dar ER, Gugjoo MB, Javaid M, Hussain S, Fazili MR, Dhama K, Alqahtani AM, Shah RA, Emran TB. Adipose Tissue-and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from Sheep: Culture Characteristics. *Animals*. 2021;11(8):2153.
18. Martinello T, Gomiero C, Perazzi A, Iacopetti I, Gemignani F, DeBenedictis GM, Ferro S, Zuin M, Martines E, Brun P, Maccatrozzo L, Chiers K, Spaas JH,

Patruno M. Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. *BMC veterinary research*. 2018;14(1):1-9.

19. Mediano DR, Sanz-Rubio D, Bolea R, Marín B, Vázquez FJ, Remacha AR, López-Pérez O, Fernández-Borges N, Castilla J, Zaragoza P, Badiola JJ, Rodellar C, Martín-Burriel I. Characterization of mesenchymal stem cells in sheep naturally infected with scrapie. *Journal of General Virology*. 2015;96(12):3715-3726.

20. Ribitsch I, Chang-Rodriguez S, Egerbacher M, Gabner S, Gueltekin S, Huber J, Schuster T, Jenner F. Sheep placenta cotyledons: a noninvasive source of ovine mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2017;23(5):298-310.

21. Sanjurjo-Rodriguez C, Castro-Vinuelas R, Hermida-Gomez T, Fernandez-Vazquez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, Díaz-Prado SM, Blanco-García FJ. Ovine mesenchymal stromal cells: morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering. *PLoS One*. 2017;12(1):0171231.

22. Guilbaud L, Dugas A, Weber M, Deflers C, Lallemand P, Liliin T Adam C, Cras A, Mebarki M, Zérah M, Faivre L, Larghero J, Jouannic JM. In utero treatment of myelomeningocele with allogenic umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in an ovine model. *Current Research in Translational Medicine*. 2022;70(1):103314.

23. Goni R, García P, Foissac S. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*. 2009;1:1-9.

24. Liu Y, Buckley CT, Almeida HV, Mulhall KJ, Kelly DJ. Infrapatellar fat pad-derived stem cells maintain their chondrogenic capacity in disease and can be used to engineer cartilaginous grafts of clinically relevant dimensions. *Tissue Engineering Part A*. 2014;20(21-22):3050-3062.
25. Hindle P, Khan N, Biant L, Péault B. The infrapatellar fat pad as a source of perivascular stem cells with increased chondrogenic potential for regenerative medicine. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017;6(1):77-87.
26. Outani H, Okada M, Yamashita A, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PloS one*. 2013;8(10):77365.
27. Roberts JH, Halper J. Connective Tissue Disorders. In: HALPER, J. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. 2. ed. Berlin:Springer, 2021. p. 323-335.
28. Van Damme T, Colige A, Syx D, Giunta C, Lindert U, Rohrbach M, Aryani O, Alanay Y, Simsek-Kiper PO, Kroes HY, Devriendt K, Thiry M, Symoens S, De Paepe A, Malfait F. Expanding the clinical and mutational spectrum of the Ehlers–Danlos syndrome, dermatosparaxis type. *Genetics in Medicine*. 2016;18(9):882-891.
29. Simoni Gouveia JJ, Cunha SMF, Almeida EM, Nogueira JF, Souza Filho JLP, Menezes DR, Gouveia GV. Molecular and genealogical analyses reveal multiple sources of the mutation associated with dermatosparaxis in Brazilian White Dorper sheep. *Small Ruminant Research*. 2016;140:46-49.
30. Andrade DG, Dalanezi FM, Trecenti AS, Cunha PHJ, Borges AS, Oliveira-Filho JP. Prevalence study of SNP c. 421G> T in the ADAMTS2 gene responsible

for dermatosparaxis in White Dorper sheep in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016;36:73-76.

31. Nogueira JF, Borges AS, Andrade DGA, Bezerra FCM, Oliveira-Filho JP, Cunha SMF, Gouveia G, Simoni Gouveia JJ. Deepening the knowledge about dermatosparaxis in Brazilian White Dorper population: Basis for the development and implementation of a genetic disease eradication program in sheep. *Livestock Science*. 2018;217:162-166.

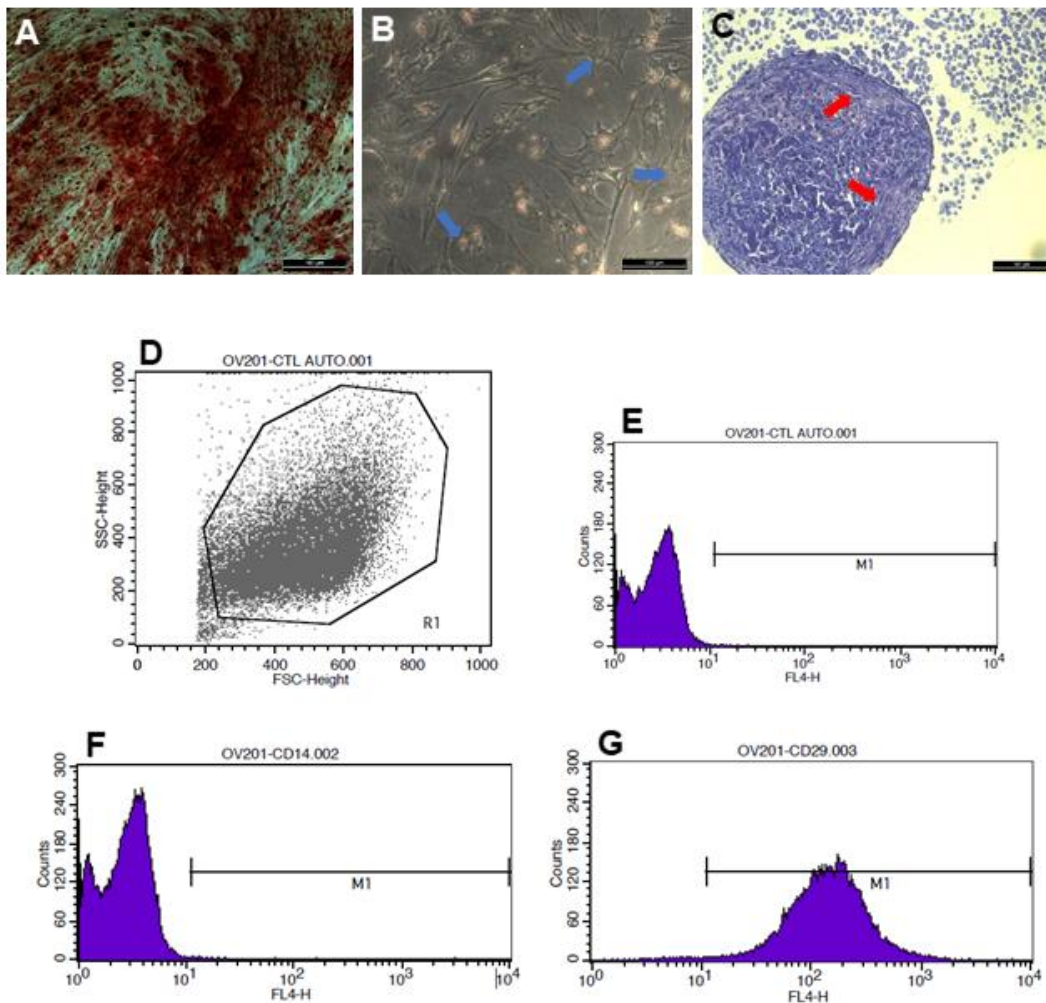
32. Makpol S, Jam FA, Yusof YAM, Ngah WZW. Modulation of collagen synthesis and its gene expression in human skin fibroblasts by tocotrienol-rich fraction. *Archives of medical science*. 2011;7(5):889-895.

33. Nuryana CT, Haryana SM, Wirohadidjojo YW, Arfian N. *Achatina fulica* mucous improves cell viability and increases collagen deposition in UVB-irradiated human fibroblast culture. *Journal of stem cells & regenerative medicine*. 2020;16(1):26.

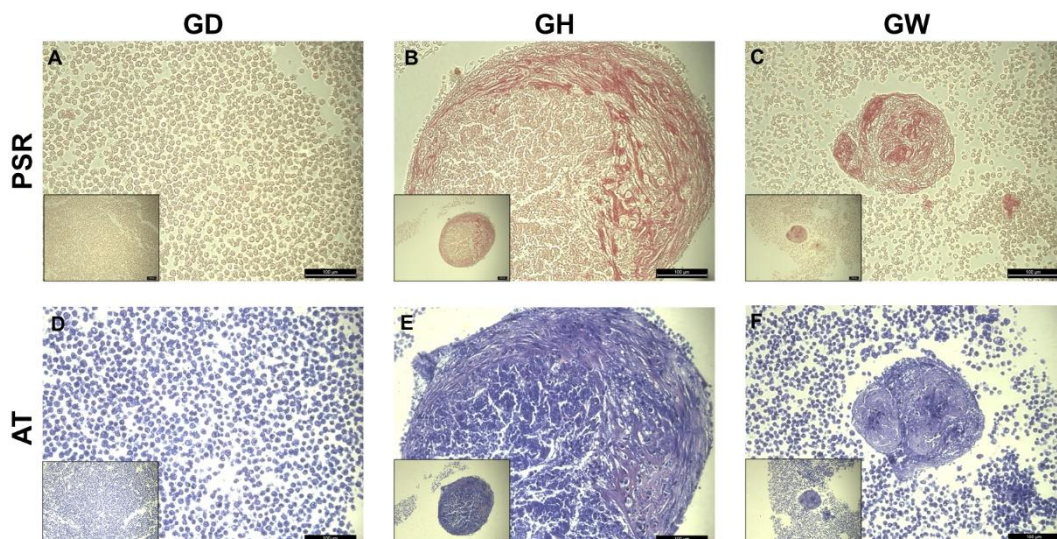
34. Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(13):2524-2529.

**Quadro 1** – Primers iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

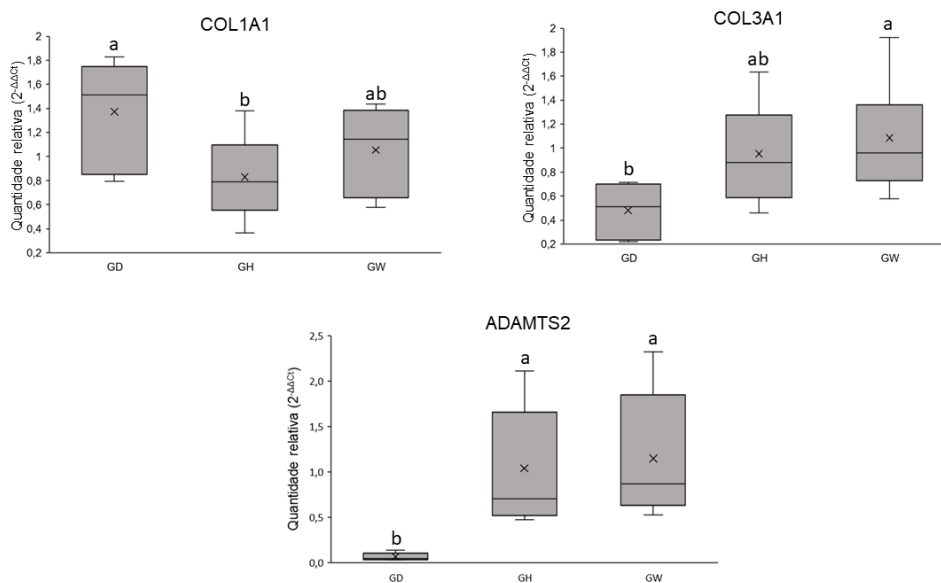
<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b><i>ADAMTS-2</i></b>	TCACGACGAGTACCACGATCA	CCCGAGGGCCCAAAGTC
<b><i>COL1A1</i></b>	CCTTTCTCCATGCCTTCTTAGG	TGCATTGTTTCCTGTGTCTTTTG
<b><i>COL3A1</i></b>	CTTCCAATAACACTGCGTTACATTCT	ATGGTAAGCACCGTCATTGCT
<b><i>CD34</i></b>	GCCATTCCGCGAGACAAC	TCCCAGCCACGTCACA
<b><i>PTPRC/CD45</i></b>	GGTACACCATTTCGCGGATCT	GCGTATACCGTCCGTGCATT
<b><i>NT5E/CD73</i></b>	CCGGATGAGATGTCCTGGAA	CCGGATGCCACCTCCAT
<b><i>THY1/CD90</i></b>	ACGCCCATGCAGTATGAGTTC	GGCCTAGTGACCCCATTGG
<b><i>GAPDH</i></b>	TGCCGCCTGGAGAAACC	AGGCCTGCTTCACCACCTT
<b><i>ACTB</i></b>	CAGTTCGCCATGGATGATGA	ATGCCGGAGCCGTTGTC
<b><i>B2M</i></b>	GGACGCCATCCAGCGTAT	TTCTGGCGGGTGTCTTGAG
<b><i>HPRT</i></b>	GGCTCGAGATGTGATGAAGGA	AGCACACAGAGGGCCACAA
<b><i>RPS5</i></b>	CACCAACTCCATGATGATGCA	GCGCACGGTCATGAGCTT
<b><i>RPS19</i></b>	TGGCAGCCTTCCTCAAAAAG	GACGGTGTCCACCCATTGAG



**Figura 1** – Caracterização de células tronco mesenquimais ovinas. A - diferenciação adipogênica, coloração vermelho de alizarina, evidenciando deposição de matriz de cálcio, microscopia optica 100X; B - diferenciação adipogênica, coloração Oil Red O, inclusões intracitoplasmáticas de lipídios (setas azuis), microscopia optica 200X; C - diferenciação condrogênica, coloração azul de toluidina, presença de matriz extracelular (setas vermelhas), microscopia optica 100X. D - gráfico dot plot indicando delimitação do gate de células analisadas em citometria de fluxo; E - delimitação negativa de controle autofluorescente; F - CD14<sup>-</sup>; G - CD29<sup>+</sup>.



**Figura 2** – Comparação qualitativa sobre produção de colágeno nos três grupos experimentais. A e D - animal do grupo GD (Ovino 1), ausência de matriz extracelular (100x); B e E - animal do grupo GH (Ovino 8), deposição de matriz extracelular evidenciada pela coloração das fibras de colágeno em azul e vermelho (200x, intercalado em 100x); C e F - animal do grupo GW (Ovino 14), deposição de matriz extracelular evidenciada pela coloração das fibras de colágeno em azul e vermelho (200x, intercalado em 100x). A, B e C: vermelho Picrosirius; D, E e F: azul de toluidina.



**Figura 3** – Quantificações relativas de transcrições dos genes *ADAMTS-2*, *COL1A1* e *COL3A1* em células tronco mesenquimais ovinas. Os dados estão apresentados em médias, medianas, percentis 25 e 75% e valores de desvio padrão. Letras diferentes diferem entre os grupos (*COL1A1* -  $P=0,029$ ; *COL3A1* -  $P=0,028$ ; *ADAMTS-2* -  $P=0,04$ ) pelo teste de Tukey.

**Tabela suplementar 1 – Viabilidade celular de células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo.**

<b>Grupo</b>	<b>Ovino</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>Média grupos (%)</b>
<i>GD</i>	1	91,2	95,1
	3	94,0	
	4	100	
<i>GH</i>	5	99,3	99,4
	6	97,5	
	7	100	
	8	100	
	9	100	
<i>GW</i>	10	95,5	95,9
	11	90,5	
	12	96,0	
	13	97,7	
	14	100	
<b>Média geral (%)</b>		97,0	

**Tabela suplementar 2** – Médias e desvio padrão da quantidade relativa de transcrições para expressão gênica de *ADAMTS-2*, *COL1A1*, *COL3A1*, *CD34*, *PTPRC/CD45*, *NT5E/CD73*, *THY1/CD90*.

<b>Gene</b>	<b>Grupo</b>	<b>Média±desvio padrão*</b>	<b>P</b>
<b>ADAMTS-2</b>	<i>GD</i>	0,062±0,043b	0,004
	<i>GH</i>	1,038±0,624a	
	<i>GW</i>	1,078±0,671a	
<b>COL1A1</b>	<i>GD</i>	1,373±0,440a	0,029
	<i>GH</i>	0,829±0,350b	
	<i>GW</i>	1,054±0,334ab	
<b>COL3A1</b>	<i>GD</i>	0,482±0,215b	0,028
	<i>GH</i>	0,952±0,417ab	
	<i>GW</i>	1,085±0,483a	
<b>CD34</b>	<i>GD</i>	4,901±0,973a	0,016
	<i>GH</i>	2,228±2,330ab	
	<i>GW</i>	1,385±1,205b	
<b>PTPRC/CD45</b>	<i>GD</i>	0,847±0,554	0,523
	<i>GH</i>	1,003±0,774	
	<i>GW</i>	1,251±0,659	
<b>NT5E/CD73</b>	<i>GD</i>	0,952±0,490b	0,013
	<i>GH</i>	1,619±0,374a	
	<i>GW</i>	1,048±0,483b	
<b>THY1/CD90</b>	<i>GD</i>	0,563±0,311	0,267
	<i>GH</i>	0,940±0,604	
	<i>GW</i>	1,178±0,648	

\*Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes (P<0,05).

**Tabela suplementar 3 – Resultados de RT-qPCR do gene *CD34*.**

	CD34_800	ACT_800	B2M_800	GAPDH_800	HPRT_800	RPS5_400	RPS19_400	Média	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$	QR	Média QR	Desvio Padrão
GD	26,135	14,772	17,803	15,590	22,542	17,994	16,951	17,609	8,526	-2,521	5,741		
GD	26,136	14,991	17,572	15,723	22,484	18,062	16,831	17,611	8,526	-2,521	5,741		
GD	26,875	15,510	17,924	16,210	22,841	18,135	16,706	17,888	8,987	-2,060	4,169		
GD	26,924	15,880	17,458	16,028	22,720	18,113	16,963	17,860	9,064	-1,983	3,954	4,901	0,973
GH	29,269	16,515	17,833	16,414	23,987	18,796	17,374	18,487	10,782	-0,265	1,201		
GH	29,431	16,651	17,936	16,413	24,017	18,766	17,338	18,520	10,911	-0,136	1,099		
GH	26,758	16,495	18,342	16,186	23,978	18,764	17,539	18,551	8,207	-2,839	7,158		
GH	26,970	16,886	17,676	16,168	23,849	18,826	17,437	18,474	8,497	-2,550	5,857		
GH	30,806	15,462	18,538	16,042	22,677	18,491	17,262	18,079	12,727	1,680	0,312		
GH	30,634	15,822	19,538	16,130	22,675	18,599	17,280	18,341	12,293	1,246	0,422		
GH	29,614	16,998	17,654	16,778	23,927	18,784	17,878	18,670	10,944	-0,103	1,074		
GH	29,057	17,072	17,978	16,698	23,990	18,788	17,668	18,699	10,358	-0,689	1,612		
GH	28,849	16,812	18,050	16,416	23,876	18,691	17,742	18,598	10,251	-0,796	1,736		
GH	28,873	17,062	18,097	16,283	23,984	18,936	17,707	18,678	10,195	-0,852	1,805	2,228	2,330
GW	30,313	16,494	17,832	16,048	23,701	18,435	17,301	18,302	12,011	0,964	0,513		
GW	29,463	16,777	18,832	16,258	23,740	18,646	17,406	18,610	10,854	-0,193	1,143		
GW	29,543	16,843	18,017	16,697	23,981	18,575	17,304	18,569	10,974	-0,073	1,052		
GW	29,459	17,047	17,576	16,590	24,006	18,492	17,361	18,512	10,947	-0,099	1,071		
GW	31,422	16,875	18,234	17,063	23,905	18,504	17,732	18,719	12,704	1,657	0,317		
GW	30,964	16,967	18,361	17,019	23,978	18,589	17,642	18,759	12,205	1,158	0,448		
GW	27,455	15,541	17,626	15,964	23,605	18,324	17,253	18,052	9,402	-1,645	3,127		
GW	27,640	15,759	18,626	16,452	23,761	18,359	17,211	18,361	9,279	-1,768	3,407	1,385	1,205

**Tabela suplementar 4 – Resultados de RT-qPCR do gene *PTPRC/CD45*.**

	PTPRC_800	ACT_800	B2M_800	GAPDH_800	HPRT_800	RPS5_400	RPS19_400	Média	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta$	QR	Média QR	Desvio Padrão
GD	33,916	14,772	17,803	15,590	22,542	17,994	16,951	17,609	16,307	2,032	0,245		
GD	33,916	14,991	17,572	15,723	22,484	18,062	16,831	17,611	16,305	2,030	0,245		
GD	32,941	15,510	17,924	16,210	22,841	18,135	16,706	17,888	15,053	0,778	0,583		
GD	31,726	15,880	17,458	16,028	22,720	18,113	16,963	17,860	13,865	-0,410	1,328		
GD	32,073	15,628	17,868	16,400	23,528	18,023	17,222	18,111	13,962	-0,313	1,243		
GD	31,965	15,968	17,750	16,574	23,446	18,189	17,375	18,217	13,748	-0,527	1,441	0,847	0,554
GH	33,542	16,515	17,833	16,414	23,987	18,796	17,374	18,487	15,056	0,781	0,582		
GH	31,537	16,651	17,936	16,413	24,017	18,766	17,338	18,520	13,016	-1,259	2,393		
GH	31,710	16,495	18,342	16,186	23,978	18,764	17,539	18,551	13,160	-1,116	2,167		
GH	33,946	16,886	17,676	16,168	23,849	18,826	17,437	18,474	15,472	1,197	0,436		
GH	32,695	15,462	18,538	16,042	22,677	18,491	17,262	18,079	14,616	0,341	0,789		
GH	33,132	15,822	19,538	16,130	22,675	18,599	17,280	18,341	14,791	0,516	0,699		
GH	34,920	16,998	17,654	16,778	23,927	18,784	17,878	18,670	16,250	1,974	0,254		
GH	34,695	17,072	17,978	16,698	23,990	18,788	17,668	18,699	15,996	1,721	0,303		
GH	33,202	16,812	18,050	16,416	23,876	18,691	17,742	18,598	14,604	0,329	0,796		
GH	32,264	17,062	18,097	16,283	23,984	18,936	17,707	18,678	13,586	-0,689	1,613	1,003	0,774
GW	31,678	16,494	17,832	16,048	23,701	18,435	17,301	18,302	13,376	-0,899	1,865		
GW	31,850	16,777	18,832	16,258	23,740	18,646	17,406	18,610	13,240	-1,035	2,049		
GW	34,323	16,843	18,017	16,697	23,981	18,575	17,304	18,569	15,754	1,479	0,359		
GW	32,863	17,047	17,576	16,590	24,006	18,492	17,361	18,512	14,351	0,076	0,949		
GW	32,863	16,875	18,234	17,063	23,905	18,504	17,732	18,719	14,144	-0,131	1,095		
GW	32,036	16,967	18,361	17,019	23,978	18,589	17,642	18,759	13,277	-0,998	1,998		
GW	34,262	15,541	17,626	15,964	23,605	18,324	17,253	18,052	16,209	1,934	0,262		
GW	32,212	15,759	18,626	16,452	23,761	18,359	17,211	18,361	13,850	-0,425	1,342	1,240	0,704

**Tabela suplementar 5 – Resultados de RT-qPCR do gene *NT5E/CD73*.**

	NT5E_400	ACT_800	B2M_800	GAPDH_800	HPRT_800	RPS5_400	RPS19_400	Média	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta$	QR	Média QR	Desvio Padrão
GD	20,194	14,772	17,803	15,590	22,542	17,994	16,951	17,609	2,585	0,168	0,890		
GD	20,109	14,991	17,572	15,723	22,484	18,062	16,831	17,611	2,498	0,081	0,945		
GD	19,668	15,510	17,924	16,210	22,841	18,135	16,706	17,888	1,781	-0,636	1,554		
GD	19,714	15,880	17,458	16,028	22,720	18,113	16,963	17,860	1,854	-0,563	1,477		
GD	21,822	15,628	17,868	16,400	23,528	18,023	17,222	18,111	3,711	1,294	0,408		
GD	21,818	15,968	17,750	16,574	23,446	18,189	17,375	18,217	3,601	1,184	0,440	0,952	0,490
GH	20,402	16,515	17,833	16,414	23,987	18,796	17,374	18,487	1,916	-0,501	1,416		
GH	19,871	16,651	17,936	16,413	24,017	18,766	17,338	18,520	1,351	-1,066	2,094		
GH	20,541	16,495	18,342	16,186	23,978	18,764	17,539	18,551	1,990	-0,427	1,344		
GH	20,750	16,886	17,676	16,168	23,849	18,826	17,437	18,474	2,276	-0,141	1,102		
GH	19,508	15,462	18,538	16,042	22,677	18,491	17,262	18,079	1,429	-0,988	1,983		
GH	20,324	16,998	17,654	16,778	23,927	18,784	17,878	18,670	1,654	-0,763	1,697		
GH	20,035	17,072	17,978	16,698	23,990	18,788	17,668	18,699	1,336	-1,081	2,115		
GH	20,667	16,812	18,050	16,416	23,876	18,691	17,742	18,598	2,069	-0,348	1,273		
GH	20,463	17,062	18,097	16,283	23,984	18,936	17,707	18,678	1,785	-0,632	1,550	1,619	0,374
GW	19,924	16,494	17,832	16,048	23,701	18,435	17,301	18,302	1,623	-0,794	1,734		
GW	20,376	16,843	18,017	16,697	23,981	18,575	17,304	18,569	1,807	-0,610	1,526		
GW	20,039	17,047	17,576	16,590	24,006	18,492	17,361	18,512	1,527	-0,890	1,853		
GW	21,272	16,875	18,234	17,063	23,905	18,504	17,732	18,719	2,553	0,136	0,910		
GW	21,162	16,967	18,361	17,019	23,978	18,589	17,642	18,759	2,402	-0,015	1,010		
GW	21,440	15,541	17,626	15,964	23,605	18,324	17,253	18,052	3,388	0,971	0,510		
GW	20,895	15,759	18,626	16,452	23,761	18,359	17,211	18,361	2,534	0,117	0,922		
GW	21,190	16,146	17,994	16,496	23,796	18,299	17,256	18,331	2,859	0,442	0,736		
GW	21,204	15,891	17,317	16,542	23,814	18,145	17,158	18,145	3,060	0,643	0,640	1,094	0,490

**Tabela suplementar 6 – Resultados de RT-qPCR do gene *THY1/CD90*.**

	THY1_400	ACT_800	B2M_800	GAPDH_800	HPRT_800	RPS5_400	RPS19_400	Média	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta$	QR	Média QR	Desvio Padrão
GD	19,614	14,772	17,803	15,590	22,542	17,994	16,951	17,609	2,005	0,267	0,831		
GD	19,613	14,991	17,572	15,723	22,484	18,062	16,831	17,611	2,002	0,264	0,833		
GD	21,458	15,510	17,924	16,210	22,841	18,135	16,706	17,888	3,570	1,832	0,281		
GD	21,297	15,880	17,458	16,028	22,720	18,113	16,963	17,860	3,436	1,698	0,308	0,563	0,311
GH	19,693	16,515	17,833	16,414	23,987	18,796	17,374	18,487	1,206	-0,532	1,446		
GH	19,690	16,651	17,936	16,413	24,017	18,766	17,338	18,520	1,169	-0,569	1,484		
GH	20,318	16,495	18,342	16,186	23,978	18,764	17,539	18,551	1,767	0,029	0,980		
GH	20,525	16,886	17,676	16,168	23,849	18,826	17,437	18,474	2,051	0,313	0,805		
GH	21,798	15,462	18,538	16,042	22,677	18,491	17,262	18,079	3,720	1,981	0,253		
GH	22,384	15,822	19,538	16,130	22,675	18,599	17,280	18,341	4,043	2,304	0,202		
GH	19,605	16,998	17,654	16,778	23,927	18,784	17,878	18,670	0,935	-0,803	1,745		
GH	19,718	17,072	17,978	16,698	23,990	18,788	17,668	18,699	1,019	-0,719	1,646		
GH	21,525	16,812	18,050	16,416	23,876	18,691	17,742	18,598	2,927	1,189	0,439		
GH	21,755	17,062	18,097	16,283	23,984	18,936	17,707	18,678	3,076	1,338	0,396	0,940	0,604
GW	21,084	16,494	17,832	16,048	23,701	18,435	17,301	18,302	2,782	1,044	0,485		
GW	21,778	16,777	18,832	16,258	23,740	18,646	17,406	18,610	3,168	1,429	0,371		
GW	19,497	17,047	17,576	16,590	24,006	18,492	17,361	18,512	0,985	-0,754	1,686		
GW	20,504	16,875	18,234	17,063	23,905	18,504	17,732	18,719	1,786	0,047	0,968		
GW	20,554	16,967	18,361	17,019	23,978	18,589	17,642	18,759	1,794	0,056	0,962		
GW	18,985	15,541	17,626	15,964	23,605	18,324	17,253	18,052	0,933	-0,805	1,748		
GW	19,083	15,759	18,626	16,452	23,761	18,359	17,211	18,361	0,721	-1,017	2,024	1,178	0,648

## ***CAPÍTULO 3***

## DISCUSSÃO GERAL

Para caracterização por citometria de fluxo, foram testados sete anticorpos conjugados, de outras espécies alvo e que não apresentavam descrição de reatividade pelo fabricantes, de modo a identificar reconhecimento de células ovinas, sendo eles: *mouse anti-human* CD14 APC (BD Biosciences; Clone M5E2), *mouse anti-human* CD29 APC (eBioscience; Clone TS2/16), *rat anti-dog* CD45 FITC (eBioscience; Clone YKIX716.13), *rat anti-mouse* CD44 PE (BD Biosciences; Clone IM7), *mouse anti-human* CD90 APC (BD Biosciences; Clone 5E10), *mouse anti-dog* CD34 PE (BD Biosciences; Clone 1H6) e *mouse anti-human* HLA-DR FITC (BD Biosciences; Clone TU36), utilizando como controle autofluorescência. Como amostra padrão, foram utilizados sangue periférico (CD14, CD29, CD45 e HLA-DR) e medula óssea (CD34).

Apesar de estudos mostrarem que alguns anticorpos *anti-human* podem apresentar reação cruzada com células ovinas (MEDIANO et al., 2015; VAHEDI et al., 2016; SANJURJO-RODRIGUEZ et al., 2017), foram testados quatro anticorpos específicos para humanos, no entanto apenas dois reconheceram a espécie ovina, CD14 e CD29. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1a.

**Tabela 1a** – Citometria de fluxo de anticorpos conjugados em amostras de sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e células tronco mesenquimais de tecido adiposo (oCTM-TA) ovinos.

<b>Análise</b>	<b>Amostra</b>	<b>Positividade</b>
Controle autofluorescente	SP	0,35%
	oCTM-TA	0,18%
	MO	1,87%
CD14	SP	5,67%
	oCTM-TA	2,82%
CD29	SP	60,14%
	oCTM-TA	99,63%
CD34	MO	5,13%
	oCTM-TA	6,85%
CD45	SP	1,92%
	oCTM-TA	1,69%
HLA-DR	SP	1,48%
	oCTM-TA	1,38%
CD44	oCTM-TA	0,82%
CD90	oCTM-TA	14,62%

Levando em consideração que o colágeno do tipo I, principal colágeno afetado na dermatosparaxia, está presente também na matriz extracelular depositada nas diferenciações condrogênicas, a utilização deste marcador pela técnica de imuno-histoquímica buscou evidenciar a marcação de colágeno do tipo I nas micromassas, assim como encontrado por Zhang e colaboradores (2010) e Musumeci e colaboradores (2014). No entanto, as marcações não foram satisfatórias, sendo necessários testes com outros anticorpos afim de aprimorar estes resultados.

Para obtenção da marcação imuno-histoquímica, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica com tampão citrato, em banho maria por

45 minutos, após, realizado bloqueio da peroxidase endógena com kit comercial DAKO (EUA), em estufa a 37°C, por 30 minutos, seguido de bloqueio de proteínas inespecíficas com leite desnatado a 3%, por 30 minutos.

O anticorpo primário utilizado foi *Anti-collagen I* (ab254113) rabbit polyclonal (Abcam, EUA), na diluição 1:500, *over-night*, em câmara úmida refrigerada (4°C a 8°C). A etapa seguinte consistiu na marcação com anticorpo secundário EnVision Flex/HRP (DAKO, EUA), em câmara úmida em temperatura ambiente, por uma hora. Após as etapas de marcação, as lâminas foram incubadas com cromógeno diamino benzidina (DAB - DAKO, EUA) e, após, contracoradas com hematoxilina.

Para sumarizar os resultados de expressão gênica e identificação de colágeno, os dados estão agrupados na tabela 2a.

**Tabela 2a** – Resumo dos resultados nos grupos experimentais, acerca da expressão gênica de *ADAMTS-2*, *COL1A1* e *COL3A1*, e das colorações especiais *Picrosirius red* e azul de toluidina.

Técnica	Gene/Corante	GD	GH	GW
RT-qPCR	<i>ADAMTS-2</i>	↓	↑	↑
	<i>COL1A1</i>	↑	↓	=
	<i>COL3A1</i>	↓	=	↑
Colorações especiais	PSR	X	+	+
	AT	X	+	+

PSR: *Picrosirius red*; AT: Azul de toluidina; ↑: *upregulation*; ↓: *downregulation*; =: sem diferença estatística entre os grupos; X: colágeno não identificado; +: colágeno identificado.

Sobre a expressão gênica por RT-qPCR, para o gene *ADAMTS-2*, a expressão foi muito menor no grupo de animais com dermatosparaxia, quando comparado ao GH e GW (17 e 19 vezes menor, respectivamente). Já para os colágenos do tipo I e tipo III, a expressão gênica foi maior no GD e GW, respectivamente.

A técnica de coloração com *Picrosirius red* permitiu a identificação de fibras de colágeno em matriz extracelular de diferenciações condrogênicas nas

amostras dos grupos GH e GW, não sendo identificadas no GD, assim como obtido pela coloração com azul de toluidina.

## CONCLUSÃO GERAL

As células tronco mesenquimais ovinas demonstraram seu potencial *in vitro* para utilização em modelos experimentais da dermatosparaxia ovina, com potencial transversal para estudos da doença nos humanos, principalmente por apresentar semelhança clínica entre a enfermidade dos ovinos com a *dEDS*, evitando potenciais discrepâncias quando utilizado o modelo murino.

Ainda, o método de colheita pode ser empregado na obtenção de CTM de ovinos, pois apresenta fácil aplicação e reprodutibilidade.

Os anticorpos *rat anti-dog* CD45 FITC (eBioscience; Clone YKIX716.13), *rat anti-mouse* CD44 PE (BD Biosciences; Clone IM7), *mouse anti-human* CD90 APC (BD Biosciences; Clone 5E10), *mouse anti-dog* CD34 PE (BD Biosciences; Clone 1H6) e *mouse anti-human* HLA-DR FITC (BD Biosciences; Clone TU36) não apresentam reação cruzada com células ovinas, não sendo possível empregá-los como opção de marcadores de superfície para caracterização imunofenotípica das oCTM-TA.

Estudos acerca do potencial das oCTM-TA em cultivos tridimensionais se fazem necessários para completo entendimento do comportamento destas células no desenvolvimento de organóides e plataformas experimentais da doença.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, D.G.A.; PAVAN, L.F.; AMORIM, R.M.; CHIACCHIO, S.B.; LAUFER-AMORIM, R.; GONÇALVES, R.C.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 443-448, 2014.

AUGUSTINE, R. Skin bioprinting: a novel approach for creating artificial skin from synthetic and natural building blocks. *Progress in biomaterials*, v. 7, n. 2, p. 77-92, 2018.

BARBERINI, D.J.; FREITAS, N.P.P.; MAGNONI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUDANO, M.J.; GOLIM, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem cell research & therapy*, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2014.

BRADY, A.F.; DEMIRDAS, S.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; GHALI, N.; GIUNTA, C.; KAPFERER-SEEBACHER, I.; KOSHO, T.; MENDOZA-LONDONO, R.; POPE, M.F.; ROHRBACH, M.; DAMME, T.V.; VANDERSTEEN, A.; MOURIK, C.V.; VOERMANS, N.; ZSCHOCKE, J.; MALFAIT, F. The Ehlers–Danlos syndromes, rare types. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. v. 175, p. 70-115, 2017.

CERQUEIRA, M.T.; MARQUES, A.P.; REIS, R.L. Using stem cells in skin regeneration: possibilities and reality. *Stem cells and development*, v. 21, n. 8, p. 1201-1214, 2012.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

COLIGE, A.; SIERON, A. L.; LI, S.; SCHWARZE, U.; PETTY, E.; WERTELECKI, W.; WILCOX, W.; KRAKOW, D.; COHN, D. H.; REARDON, W.; BYERS, P. H.; LAPIERE, C. M.; PROCKOP, D. J.; NUSGENS, B. V. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *The American Journal of Human Genetics*, v. 65, n. 2, p. 308-317, 1999.

COLIGE, A.; VANDENBERGHE, I.; THIRY, M.; LAMBERT, C.A.; BEEUMEN, J.V.; LI, S.W.; PROCKOP, D.J.; LAPIERE, C.M.; NUSGENS, B.V. Cloning and

characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 8, p. 5756-5766, 2002.

DEHKORDI, A.N.; BABAHEYDARI, F.M.; CHEHELGERDI, M.; DEHKORDI, S.R. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem cell research & therapy*, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2019.

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

DUBAIL, J.; APTE, S.S. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biology*, v. 44, p. 24-37, 2015.

FERNANDES, R.J.; HIROHATA, S.; ENGLE, J.M.; COLIGE, A.; COHN, D.H.; EYRE, D.R.; APTE, S.S. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3: insights on dermatosparaxis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 34, p. 31502-31509, 2001.

GAO, F.; CHIU, S.M.; MOTAN, D.A.L.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H.L.; TSE, H.F.; FU, Q.L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, v. 7, n. 1, p. e2062-e2062, 2016.

GOUVEIA, J.J.S.; CUNHA, S.M.F.; DE ALMEIDA, E.M.; NOGUEIRA, J.F.; SOUZA FILHO, J.L.P.; MENEZES, D.R.; GOUVEIA, G.V. Molecular and genealogical analyses reveal multiple sources of the mutation associated with dermatosparaxis in Brazilian White Dorper sheep. *Small Ruminant Research*, v. 140, p. 46-49, 2016.

GNECCHI, M.; HE, H.; NOISEUX, N.; LIANG, O. D.; ZHANG, L.; MORELLO, F.; MU, H.; MELO, L. G.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V. J. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *The FASEB Journal*, v. 20, n. 6, p. 661-669, 2006.

GOFF, C.; SOMERVILLE, R.P.; KESTELOOT, F.; POWELL, K.; BIRK, D.E.; COLIGE, A.C.; APTE, S.S. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development*, v. 133, p. 1587–1596, 2006.

GUGJOO, M.B.; AMARPAL. Mesenchymal stem cell research in sheep: Current status and future prospects. *Small Ruminant Research*, v. 169, p. 46-56, 2018.

HANSET, R.; LAPIERE, C.M. Inheritance of dermatosparaxis in the calf. A genetic defect of connective tissue. *Journal of Heredity*, v. 65, n. 6, p. 356-358, 1974.

HEIDARI, B.; SHIRAZI, A.; AKHONDI, M.M.; HASSANPOUR, H.; BEHZADI, B.; NADERI, M.M.; SARVARI, A.; BORJIAN, S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna journal of medical biotechnology*, v. 5, n. 2, p. 104, 2013.

JIAN, H.; WANG, M.; WANG, S.; WANG, A.; BAI, S. 3D bioprinting for cell culture and tissue fabrication. *Bio-Design and Manufacturing*, v. 1, n. 1, p. 45-61, 2018.

KENGLA, C.; ATALA, A.; LEE, S.J. Bioprinting of organoids. In: ATALA, A.; YO, J.J. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Cambridge:Academic Press, 2015. chap15, p. 271-282.

LAPIÈRE, C. M.; LENAERS, A; KOHN, L. D. Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, n. 12, p. 3054-3058, 1971.

LI, S.W.; ARITA, M.; FERTALA, A.; BAO, Y.; KOPEN, G.C.; LANGSJO, T.K.; HYTTINEN, M.M.; HELMINEN, H.J.; PROCKOP, D.J. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochemical Journal*, v. 355, n. 2, p. 271-278, 2001.

LIANG, X.; DING, Y.; ZHANG, Y.; TSE, H., LIAN, Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell transplantation*, v. 23, n. 9, p. 1045-1059, 2014.

MALFAIT, F.; FRANCOMANO, C.; BYERS, P.; BELMONT, J.; BERGLUND, B.; BLACK, J.; ... TINKLE, B. The 2017 international classification of the Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. v. 175, p. 8-26, 2017.

MEDIANO, D.R.; SANZ-RUBIO, D.; BOLEA, R.; MARÍN, B.; VÁZQUEZ, F.J.; REMACHA, A.R.; LÓPEZ-PÉREZ, O.; FERNÁNDEZ-BORGES, N.; CASTILLA, J.; ZARAGOZA, P.; BADIOLA, J.J.; RODELLAR, C.; MARTÍN-BURRIEL, I. Characterization of mesenchymal stem cells in sheep naturally infected with scrapie. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 12, p. 3715-3726, 2015.

MONTEAGUDO, L. V.; FERRER, L. M.; CATALAN-INSA, E.; SAVVA, D.; MCGUFFIN, L. J.; TEJEDOR, M. T. In silico identification and three-dimensional modelling of the missense mutation in ADAMTS 2 in a sheep flock with dermatosparaxis. *Veterinary Dermatology*, v. 26, n. 1, p. 49-e16, 2015.

MUSUMECI, G.; MOBASHERI, A.; TROVATO, F. M.; SZYCHLINSKA, M. A.; GRAZIANO, A. C. E.; FURNO, D. L.; AVOLA, R.; MANGANO, S.; GIUFFRIDA, R.; CARDILE, V. Biosynthesis of collagen I, II, RUNX2 and lubricin at different time points of chondrogenic differentiation in a 3D in vitro model of human

mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Acta Histochemica*, v. 116, n. 8, p. 1407-1417, 2014.

NOGUEIRA, J.F.; BORGES, A.S.; DE ANDRADE, D.G.A.; BEZERRA, F.C.M.; DE OLIVEIRA-FILHO, J.P.; CUNHA, S.M.F.; GOUVEIA, G.V.; DE SIMONI GOUVEIA, J.J. Deepening the knowledge about dermatosparaxis in Brazilian White Dorper population: Basis for the development and implementation of a genetic disease eradication program in sheep. *Livestock Science*, v. 217, p. 162-166, 2018.

ONG, C.S.; YESANTHARAO, P.; HUANG, C.Y.; MATTSON, G.; BOKTOR, J.; FUKUNISHI, T.; ZHANG, H.; HIBINO, N. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric research*, v. 83, n. 1, p. 223-231, 2017.

PHUA, Q. H.; HAN, H. A.; SOH, B. S. Translational stem cell therapy: vascularized skin grafts in skin repair and regeneration. *Journal of Translational Medicine*, v. 19, p. 1-11, 2021.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*, v. 36, n. 3, p. S8-S12, 2005.

RAWAL, P.; TRIPATHI, D.M.; RAMAKRISHNA, S.; KAUR, S. Prospects for 3D bioprinting of organoids. *Bio-Design and Manufacturing*, v. 4, n. 3, p. 627-640, 2021.

REN, Y.; YANG, X.; MA, Z.; SUN, X.; ZHANG, Y.; LI, W.; YANG, H.; QIANG, L.; YANG, Z.; LIU, Y.; DENG, C.; ZHOU, L.; WANG, T.; LIN, J.; LI, T.; WU, T.; WANG, J. Developments and opportunities for 3D bioprinted organoids. *International Journal of Bioprinting*, v. 7, n. 3, 2021.

ROBERTS, J.H.; HALPER, J. Connective tissue disorders in domestic animals. In: HALPER, J. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. 2. ed. Berlim:Springer, 2021. p. 323-335.

SALARIS, F.; ROSA, A. Construction of 3D in vitro models by bioprinting human pluripotent stem cells: Challenges and opportunities. *Brain Research*, v. 1723, p. 146393, 2019.

SANJURJO-RODRIGUEZ, C.; CASTRO-VINUELAS, R.; HERMIDA-GOMEZ, T.; FERNANDEZ-VAZQUEZ, T.; FUENTES-BOQUETE, I.M.; DE TORO-SANTOS, F.J.; DÍAZ-PRADO, S.M.; BLANCO-GARCÍA, F.J. Ovine mesenchymal stromal cells: morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering. *PLoS One*, v. 12, n. 1, p. e0171231, 2017.

SCHNELLMANN, R. Advances in ADAMTS biomarkers. In: MAKOWSKI, G.S. *Advances in Clinical Chemistry*. Cambridge:Academic Press, 2022. p. 1, 2022.

STEWART, M. C.; STEWART, A. A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v. 27, n. 2, p. 243-261, 2011.

TARASSOLI, S.P.; JESSOP, Z.M.; AL-SABAH, A.; GAO, N.; WHITAKER, S.; DOAK, S.; WHITAKER, I.S. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, v. 71, n. 5, p. 615-623, 2018.

VAHEDI, P.; SOLEIMANIRAD, J.; ROSHANGAR, L.; SHAFAEI, H.; JAROLMASJED, S.; CHAROUDEH, H.N. Advantages of sheep infrapatellar fat pad adipose tissue derived stem cells in tissue engineering. *Advanced pharmaceutical bulletin*, v. 6, n. 1, p. 105, 2016.

VROMAN, R.; MALFAIT, A.M.; MILLER, R.E.; MALFAIT, F.; SYX, D. Animal models of Ehlers–Danlos syndromes: phenotype, pathogenesis, and translational potential. *Frontiers in genetics*, v. 12, 2021.

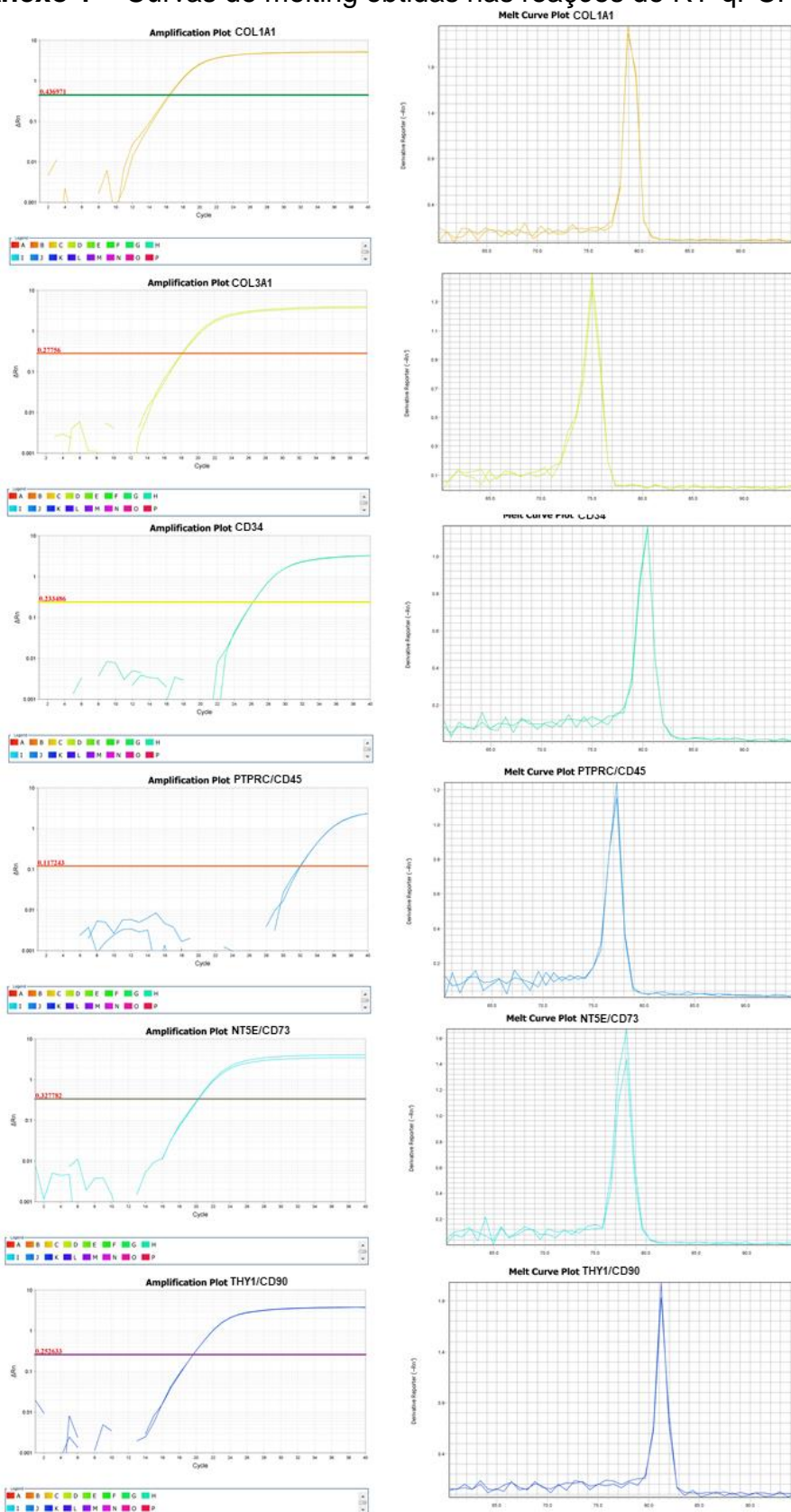
ZHANG, L.; SU, P.; XU, C.; YANG, J.; YU, W.; HUANG, D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnology letters*, v. 32, p. 1339-1346, 2010.

ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.H.; FANG, Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. *Animal genetics*, v. 43, n. 4, p. 471-473, 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P. HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

## Anexos

### Anexo 1 – Curvas de melting obtidas nas reações de RT-qPCR.



**Anexo 2 – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA FMVZ, UNESP.**



## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "DERMATOPARAXIA OVINA: DESENVOLVIMENTO DE MODELO IN VITRO COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS" **Protocolo CEUA 0148/2021**, a ser conduzido por João Pedro Marmol de Oliveira, responsável/orientador Rogério Martins Amorim, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	01/09/2021 a 01/05/2023
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	OVINA / OVIS ARIES /
<b>Raça</b>	White Dorper
<b>Nº de animais machos</b>	0
<b>Nº de animais fêmeas</b>	0
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	15
<b>Peso médio de animais machos</b>	0
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	0
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	40
<b>Idade</b>	3 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	Rebanho da Clínica de Grandes Animais

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 18/08/2021**

**JULIANY GOMES QUITZAN**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu