UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO SOLAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE COLAGENASES NA PELE DE EQUINOS COM ASTENIA DÉRMICA REGIONAL HEREDITÁRIA

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

BOTUCATU - SP

JANEIRO de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO SOLAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE COLAGENASES NA PELE DE EQUINOS COM ASTENIA DÉRMICA REGIONAL HEREDITÁRIA

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

Tese apresentada junto ao programa de pós-graduação como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Coorientadores: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho e Dr. Peres Ramos Badial

Botucatu
Janeiro de 2020

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

Cunha Neto, Campo Amor Vieira da.
Influência da radiação solar na expressão gênica de colagenases na pele de equinos com astenia dérmica regional hereditária / Campo Amor Vieira da Cunha Neto. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Alexandre Secorun Borges
Coorientador: José Paes de Oliveira Filho
Coorientador: Peres Ramos Badial
Capes: 50501062

1. Equino. 2. Colagenases. 3. Astenia. 4. Pele - Doenças. 5. Expressão gênica. 6. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Expressão gênica; MMP1; MMP13; MMP8; qPCR.

Nome do autor: Campo Amor Vieira da Cunha Neto

Título: INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO SOLAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE COLAGENASES NA PELE DE EQUINOS COM ASTENIA DÉRMICA REGIONAL HEREDITÁRIA EQUINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Presidente e orientador
Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior
Membro
Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP – BOTUCATU.

Prof. Luiz Cláudio Nogueira Mendes
Membro
Departamento: Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba.

Prof. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro
Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV da Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Uberlândia, MG.

Data da defesa: 21 de janeiro de 2020.

A Família!

A minha amada esposa, sempre doce, Analice. *Pelo amor, paciência, força e cumplicidade, por trazer em seu ventre a mais bela dádiva que Deus poderia nos dar, a SOFIA, nosso pinguinho que luz, que ainda à caminho, já nos enche de alegria e esperança, esperança no amanhã, no ser humano, no mundo, mundo o qual me empenharei ao máximo, para ajudar a torná-lo cada dia melhor.*

Aos meus pais, Neri Vieira da Cunha *e* Maria Nicen da Cunha, *pela vida, pelo amor e apoio incondicional, pelos exemplos de honra e dignidade, os quais me conduzem pelas estradas da vida, tenho certeza que sempre me guiarão ao caminho correto.*

Aos meus irmãos, Vlademir Vieira da Cunha, Edna Vieira da Cunha *(in memoriam) e* Neri Hellen Vieira da Cunha, *pelo apoio, amor, incentivo, confiança e compreensão em tantos momentos.*

Agradecimentos

*À **Santíssima Trindade**, pelo dom da vida, amor e misericórdia, por der me dado forças nesta caminhada. Também à **Maria, Santa Mãe de Deus**, intercessora, na imagem de **Nossa Senhora de Aparecida**, pois tudo em minha vida está em suas mãos santas e misericordiosas.*

*Ao Professor e orientador **Alexandre Secorun Borges**, pela recepção, pela amizade, pelos ensinamentos, confiança, conselhos, gentileza, convivência e principalmente pelo apoio e oportunidades.*

*Aos coorientadores, professores **José Paes de Oliveira Filho** e **Peres Ramos Badial**, pela imensa ajuda no desenvolvimento deste projeto, pelos ensinamentos, atenção, cordialidade e respeito, pela amizade e inúmeros momentos de alegre convivência.*

*Ao professor **João Pessoa Araújo Júnior** e toda sua equipe de trabalho do IBTEC, por sempre disponibilizar um espaço de trabalho na bancada do laboratório que coordena, pela ajuda e ensinamentos nos vários momentos de dúvidas, pela amizade e cordialidade e também diversos momentos de excelente convivência.*

*Ao professor **Deilson Elgui de Oliveira** e às Dras. **Camila Dantas Malossi e Mariana Vaz Rodrigues** do IBETC, pelos ensinamentos, ajuda nos estudos em biologia molecular e principalmente pela amizade, atenção e carinho.*

*Aos grandes amigos e colegas, **Diego José Zanzarini Delfiol, Giovane Olivo** e **César Erineudo Tavares de Araújo**, pela amizade, convivência, ensinamentos e conselhos, pelos incontáveis momentos de alegria e fraternidade, tanto em casa quanto no ambiente de trabalho.*

*Aos amigos e colegas de pós graduação, "Galera da Salinha", **Danilo Andrade, Raissa Leite, Ana Luísa, Anelize Trecenti, Daiane Rodrigues, Larissa Andrade, Luiza Zakia, Pedro Bernardino, Lukas Garrido, Julia Franco, Amanda Caceres, Roberta Basso, Natalia Lourenço e Natalia Dias,** pela amizade, pelo apoio e carinho, pela atenção e , principalmente, pela ajuda em todos os momentos do projeto, sem vocês não teria sido possível executar tantas tarefas.*

*Aos Professores do setor de cirurgia de grandes animais da UNESP de Botucatu, professora **Ana Liz Garcia Alves,** professor **Carlos Alberto Hussni,** professor **Marcos Jun Watanabe e Celso Antônio Rodrigues**, por sempre abrirem as portas de suas salas e estarem dispostos a ajudar, pelos ensinamentos, conselhos, pelo carinho e gentileza, pelo apoio em cederem as baias de experimentação em equinos do Biotério no setor de cirurgia de grandes animais.*

*Aos amigos e colegas da cirurgia de grandes animais UNESP de Botucatu, **João Pedro, André, Vitor Hugo, Jaqueline, Betsabéia, Gustavo, Juliana Alonso***

***e Caio Nunes**, pela amizade, carinho, vários momentos de muita alegria, pela ajuda, e principalmente pela gentileza em reprogramar suas atividades nas baias de experimentação do Biotério no setor de cirurgia afim de que nós pudéssemos utilizá-las para este projeto.*

*Aos **médicos veterinários residentes e estagiários** do setor de cirurgia de grandes animais e principalmente aos funcionários, Clotilde e Jairo, pela amizade, pelo carinho e atenção em todos esses anos que estive na UNESP em Botucatu.*

*Aos docentes do Departamento de Clínica Veterinária, professores **Roberto Calderon Gonçalves, Simone Biagio Chiacchio, Rogério Martins Amorim**, pelo incentivo inenarrável, pelo apoio, ensinamentos e amizade, por todos os momentos de convivência que sempre agregam muito na minha vida pessoal e profissional.*

*Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, **Marlene Dias de Camargo e Izabel Cristina Castro** e aos funcionários da Clínica de Grandes Animais **Cesar Leme e Marco Antônio Simão** pela colaboração, amizade e gentiliza durante o curso de pós-graduação.*

*Aos **médicos veterinários residentes, alunos, estagiários e funcionários** do setor de clínica de grandes animais da UNESP Botucatu pela amizade e apoio nas atividades acadêmicas.*

*A **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado, possibilitando a execução deste projeto.*

*Aos membros do **conselho de Pós-Graduação em Medicina Veterinária** e aos **colaboradores de apoio administrativo** da seção de pós-graduação, que sob a supervisão de **Carlos Pazini Junior**, sempre estiveram prontos para resolver as questões burocráticas necessárias a correta condução do programa, pelo carinho e atenção.*

*À toda equipe da fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, em especial às pessoas do Sr. **Nelson Donizetti Fernandes** e aos colegas médicos veterinários **Eduardo Soares Caula, Erica Hermoso Arantes Pereira, Wellington Nascimento (Zé), Ariela Zanetti e Guilherme Martinez**, pelo pleno apoio, pela amizade, confiança e tantos momentos que tornaram minha vida melhor e mais fácil.*

*Aos **Cavalos**, por me permitir vivenciar um sonho de infância, animais de nobreza e força inefáveis, que me ensinam, a cada dia, observar, servir e lutar.*

"Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina e não perguntar o que se ignora."

São Beda (672-735 d.C.)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Visão geral de 23 Metaloproteinases de Matriz (MMP) identificadas em humanos e seus respectivos nomes comuns. Adaptado de Klein & Bischoff (2011). 14

Tabela 2. Sequência dos conjuntos de primers dos genes alvo (MMP1, MMP8 e MMP13 equino) e endógenos (β-actina e GAPDH equina) utilizados na reação de qPCR. O número de acesso corresponde a sequência do RNAm para os respectivos genes no banco de dados do NCBI. 26

Tabela 3. Valores de Slope, coeficiente de correlação (R^2) e eficiência de reação para cada um dos genes alvo e endógenos 34

Tabela 4. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 39

Tabela 5. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 39

Tabela 6. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 40

Tabela 7. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 40

Tabela 8. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi

considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 42

Tabela 9. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 43

Tabela 10. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 45

Tabela 11. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 46

Tabela 12. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 48

Tabela 13. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 49

Tabela 14. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 49

Tabela 15. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão

descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 50

Tabela 16. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 51

Tabela 17. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 52

Tabela 18. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 54

Tabela 19. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 55

Tabela 20. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 57

Tabela 21. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 58

Tabela 22. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 58

Tabela 23. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente. 59

Tabela 24. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 60

Tabela 25. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente. 61

Tabela 26. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 63

Tabela 27. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento. 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais passos pós-traducionais na síntese de colágeno (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004). 5

Figura 2. Componentes do espectro eletromagnético da radiação solar total, com potencial de energia e capacidade de penetração na pele humana. Adaptado de: Wang et al. (2019). 16

Figura 3. Desenho experimental demonstrando os pontos determinados para realização das biópsias em cada momento (0 a 5, no dorso e ventre de cada animal), o esquema de restrição e exposição à radiação solar que os grupos de animais foram submetidos, além do esquema de procedimentos para as análises em laboratório. 21

Figura 4. Desenho esquemático demonstrando a posição dos conjuntos de primers e seus respectivos produtos amplificados em relação ao gene (vermelho) e a posição das junções exon-exon (degraus em preto). Primers são representados pelas setas azuis e entre cada seta os produtos amplificados. 25

Figura 5. Baias de experimentação durante a fase de restrição à luz solar. Em A e B um animal controle e um afetado, respectivamente, em C termômetro demonstrando temperatura dentro do conjunto de baias de experimentação, em D aferição da radiação solar. 31

Figura 6. Aferição da radiação solar na região de dorso (A) e ventre (B) de um equino afetado por HERDA, a direção da fotocélula do equipamento está indicada nas setas brancas. Notar, nas imagens de zoom do equipamento, a diferença de aproximadamente oito vezes entre a incidência de radiação solar na região dorsal e ventral de um equino adulto. 31

Figura 7. Boxplots demonstrando as diferenças entre exposição solar da região dorsal e ventral do GA e GC em M3 e M4. Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas (P<0,05). 32

Figura 8. Boxplot demonstrando a variação da concentração de RNA total bem como a pureza pela análise da absorbância relativa das amostras de pele de equinos do grupo afetado (GA) e grupo controle (GC). 33

Figura 9. Eletroferograma demonstrando integridade do RNA da amostra padrão pelo RNA Integrity Number (RIM) realizado no equipamento de eletroforese capilar 2100 Bioanalyzer. 33

Figura 10. Gráficos demostrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de amplificação das diluições seriadas. Em A, B gráficos são referentes aos genes alvos MMP1 e MMP8, respectivamente. 35

Figura 11. Gráficos demostrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de

amplificação das diluições seriadas. Em A e B os gráficos são referentes aos genes alvo MMP13 e endógeno β-actina, respectivamente. 36

Figura 12. Boxplots demonstrando medidas de tendência central e dispersão dos coeficientes de variação dos Cts entre os momentos experimentais dos genes endógenos β-actina e GAPDH, sem diferença estatística (P>0,05).....37

Figura 13. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatisticas (P<0,05).....41

Figura 14. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre dorso e ventre ao longo do período experimental, sendo que em cada momento, as amostras de dorso foram consideradas controles e as de ventre calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre regiões no mesmo momento (P<0,05).....44

Figura 15. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) (P<0,05).....47

Figura 16. Boxplots demonstrando a variação na expressão gênica relativa de MMP8 na pele das regiões de dorso (A, C) e de ventre (B, D) de equinos dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatisticas (P<0,05). 50

Figura 17. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 sem diferenças estatísticas entre dorso e ventre dos grupos de animais afetados (A) e controle normais (B). 53

Figura 18. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Não houveram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) (P>0,05). 56

Figura 19. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Não houveram diferenças significativas entre os momentos avaliados (P>0,05) em nenhuma das regiões de ambos os grupos. 59

Figura 20. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso e ventre do GA (A) e GC (B). não houveram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos estudados (P>0,05).....62

Figura 21. Boxplots demonstrando a comparação da expressão gênica da MMP13 na pele de dorso e ventre (A e B, respectivamente) entre os grupos GA e GC ao longo do período experimental. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos em nenhuma das regiões avaliadas (P>0,05). Em B, o valor de P acima dos diagramas do M4, indica tendência a diferença estatística entre grupos (P=0,057). 65

SUMÁRIO

RESUMO 1

ABSTRACT 2

1 INTRODUÇÃO 3

2 REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1 Estrutura, biossíntese e metabolismo do colágeno 5

2.2 Doenças genéticas do colágeno 7

2.3 Astenia cutânea regional hereditária em equinos (HERDA) 8

2.3.1 Etiopatogenia 9

2.3.2 Sinais clínicos e diagnóstico 10

2.3.3 Tratamento, prognóstico e manejo 12

2.4 Metaloproteinases de matriz (MMP) 13

2.5 Ação da radiação solar na matriz extracelular cutânea 15

2.5 Justificativa 18

3. OBJETIVO 18

3.1 Objetivos específicos 18

4 MATERIAIS E MÉTODOS 19

4.1 Animais 19

4.2 Delineamento experimental 19

4.3 Colheita das amostras 20

4.3.1 Biópsias de pele 20

4.4 Análise da expressão gênica das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real (qPCR) 22

4.4.1 Extração e purificação de RNA total 22

4.4.2 Reação da Transcriptase Reversa e produção de cDNA 24

4.4.3 Desenho dos iniciadores (*primers*) 24

4.4.4 Avaliação dos conjuntos de *primers* por PCR convencional e sequenciamento Sanger.....26

4.4.5 Análise especificidade e concentração dos *primers* e eficiência da reação qPCR 27

4.4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 28

4.5 Análise estatística.....28

5 RESULTADOS.....29

5.1 Tratamento dos grupos: restrição e exposição à radiação solar.....29

5.2 Análise da expressão gênica pela técnica de qPCR 32

5.2.1 Concentração e qualidade do RNA total das amostras.....32

5.2.2 Curvas padrão e análise da eficiência da reação de qPCR e análise de variação do gene endógeno utilizado como normalizador 34

5.3 Expressão gênica relativa das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 da pele de dorso e ventre de equinos afetados (HERDA) e normais.....37

5.3.1 MMP1.....38

5.3.2 MMP8.....48

5.3.3 MMP13.....57

6. DISCUSSÃO.....66

7. CONCLUSÃO 70

8 REFERÊNCIAS 71

9 ARTIGO CIENTÍFICO 82

10 ANEXOS.....104

ANEXO 1 - Normas da Revista Veterinary Dermatology. 104

CUNHA NETO, C.A.V. Influência da radiação solar na expressão gênica de colagenases na pele de equinos com Astenia Dérmica Regional Hereditária. Botucatu, 2020. 133 pag. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Com a hipótese do aumento da degradação cutânea de equinos com HERDA quando expostos a radiação solar, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do sol na expressão gênica das colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13) na pele de animais afetados e normais. Foram utilizados 12 equinos, seis no grupo afetados (GA) e seis normais para o grupo controle (GC). Todos os animais viviam à campo e foram submetidos a restrição de radiação solar e posteriormente expostos ao sol. Foram realizadas biópsias de pele da região dorsal e ventral dos animais em seis momentos: M0, antes da fase de restrição ao sol; M1 e M2, aos 15 e 30 dias de restrição ao sol, respectivamente; M3, M4 e M5 ao final do 1º, 3º e 15º dia de exposição ao sol, respectivamente. Com a técnica de qPCR, observou-se influência da radiação solar na expressão gênica de colagenases na pele dos equinos do GA e GC, sendo que: no M4 houve aumento significativo ($P<0,05$) da expressão relativa de MMP1 na pele dorsal de ambos os grupos, todavia o GA expressou mais MMP1 na região dorsal que o GC; houve uma maior expressão da MMP1 na região dorsal do que ventral em M4 no dois grupos; aumento na expressão de MMP8 em ventre do GA e nenhuma mudança significativa na expressão gênica de MMP13 em nenhum dos grupos. Assim, conclui-se que se deve evitar que os animais afetados fiquem expostos ao sol, pelo menos nos períodos de maior incidência de radiação solar.

Palavras chave: MMP1, MMP8, MMP13, expressão gênica, qPCR.

CUNHA NETO, C.A.V. Influence of solar radiation on gene expression of collagenases in the skin of horses with Hereditary Regional Dermal Asthenia. Botucatu, 2020. 133 pag. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

With the hypothesis of increased skin degradation in horses with HERDA when exposed to solar radiation, this study aimed to evaluate the influence of the sun on the gene expression of collagenases (MMP1, MMP8 and MMP13) on the skin of affected and normal animals. Twelve horses were used, six in the affected group (GA) and six normal in the control group (CG). All animals lived in the field and were submitted to solar radiation restriction and later exposed to the sun. Skin biopsies of the dorsal and ventral regions of the animals were performed in six moments: M0, before the sun restriction phase; M1 and M2, at 15 and 30 days of sun restriction, respectively; M3, M4 and M5 at the end of the 1st, 3rd and 15th day of exposure to the sun, respectively. With the qPCR technique, the influence of solar radiation on the gene expression of collagenases in the GA and GC horses was observed, being that: in M4 there was a significant increase ($P < 0.05$) in the relative expression of MMP1 in the dorsal skin from both groups, however, GA expressed more MMP1 in the dorsal region than CG; there was a greater expression of MMP1 in the dorsal than ventral region in M4 in the two groups; increased expression of MMP8 in the womb of GA and no significant change in gene expression of MMP13 in either group. Thus, it is concluded that the affected animals should be avoided from being exposed to the sun, at least during periods of higher incidence of solar radiation.

Key words: MMP1, MMP8, MMP13, gene expression, qPCR.

1 INTRODUÇÃO

A Astenia dérmica regional hereditária equina (HERDA) é uma enfermidade que acomete principalmente a pele possuindo caráter autossômico recessivo em equinos (TRYON et al., 2005). A HERDA acomete cavalos da raça Quarto de Milha (QM) e raças compostas pelo QM (WHITE et al., 2004; TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007). Clinicamente é observado animais com pele fina, frouxa e hiperextensível que lacera facilmente ao menor trauma causando extensas cicatrizes, de difícil reparação, (SOLOMONS, 1984; WHITE et al., 2004; BORGES et al., 2005). A afecção ocorre devido mutação no gene que codifica a proteína Ciclofilina B (CypB), ocasionando efeitos deletérios na síntese do colágeno (TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007; ISHIKAWA et al., 2012; RASHMIR-RAVEN, 2013). Além da pele, esta anormalidade na síntese de colágeno faz com que ocorram diferenças na espessura e angulação de córnea (MOCHAL et al., 2010; BADIAL et al., 2015) e na composição de tendões e ligamentos nos animais com a mutação em homozigose (GRADY et al., 2009; BOWSER et al., 2014;).

Embora os animais afetados apresentem feridas em todo o corpo, existe uma maior frequência na região dorsal, isto contribuiu para que a denominação de astenia dérmica regional fosse adotada (WHITE et al., 2004). Todavia, trabalhos demonstram que a pele é mais fina e hiperextensível em quase todo o corpo dos animais afetados (GRADY et al., 2009; BADIAL et al., 2014a). A maior ocorrência de feridas localizadas na região dorsal dos animais afetados também é atribuída a maior exposição a luz solar desta região (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; GRADY et al., 2009; RASHMIR-RAVEN, 2013; RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015). Estudos anteriores mostraram que a produção de colagenase induzida pela radiação de raios ultravioleta (solar) resultou em degradação das fibras de colágeno na pele de humanos (FISHER et al., 1996; FISHER et al., 1997; BRENNEISEN et al., 2002).

Rashmir-Raven e colaboradores demonstraram que a pele de cavalos com HERDA é mais hiperextensível quando exposta a colagenase bacteriana do que a pele de cavalos normais. Tais achados deram suporte a hipótese de que a microestrutura das fibras dos animais afetados provê uma superfície de contato mais ampla para ação enzimática devido a desorganização histológica e

estrutural (RASHMIR-RAVEN; HOPPER, R; RYAN, 2004; WHITE et al., 2004; BADIAL et al., 2014).

Considerando que a HERDA é uma das principais enfermidades genéticas de equinos da raça QM, que o rebanho desta raça é o mais numeroso no território nacional com percentuais de carreadores semelhante ao plantel americano (TRYON et al., 2009; ABQM, 2017; BADIAL et al., 2014b), que casos clínicos tem sido observados no Brasil (BORGES et al., 2005), e que a incidência de luz solar em países tropicais é maior que na América do Norte, tal pesquisa nos fornece dados clínicos e moleculares úteis para melhor compreender alguns dos eventos metabólicos que podem contribuir para o aparecimento dos sinais clínicos nos animais afetados. Além de auxiliar na tomada de medidas de manejo dos animais acometidos, este estudo pode servir como modelo para pesquisas voltadas às doenças do colágeno em outras espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura, biossíntese e metabolismo do colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo animal e o principal constituinte da matriz extracelular (KUCHARZ, 1992; KOIDE; NAGATA, 2005). Sua principal característica molecular é a forma helicoidal tripla (Figura 1) devido as três cadeias polipeptídicas formada por múltiplas sequências de três aminoácidos cujo a formula é $(Glicina\text{-}X\text{-}Y)_n$ (BRINCKMANN, 2005). Já foram identificados 28 tipos diferentes de colágeno constituídos por pelo menos 46 cadeias polipeptídicas distintas em vertebrados (BRINCKMANN, 2005; VEIT et al., 2006), sendo que em humanos foram descritos 42 genes, em 23 destes já foram caracterizadas mais de 1300 mutações (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004).

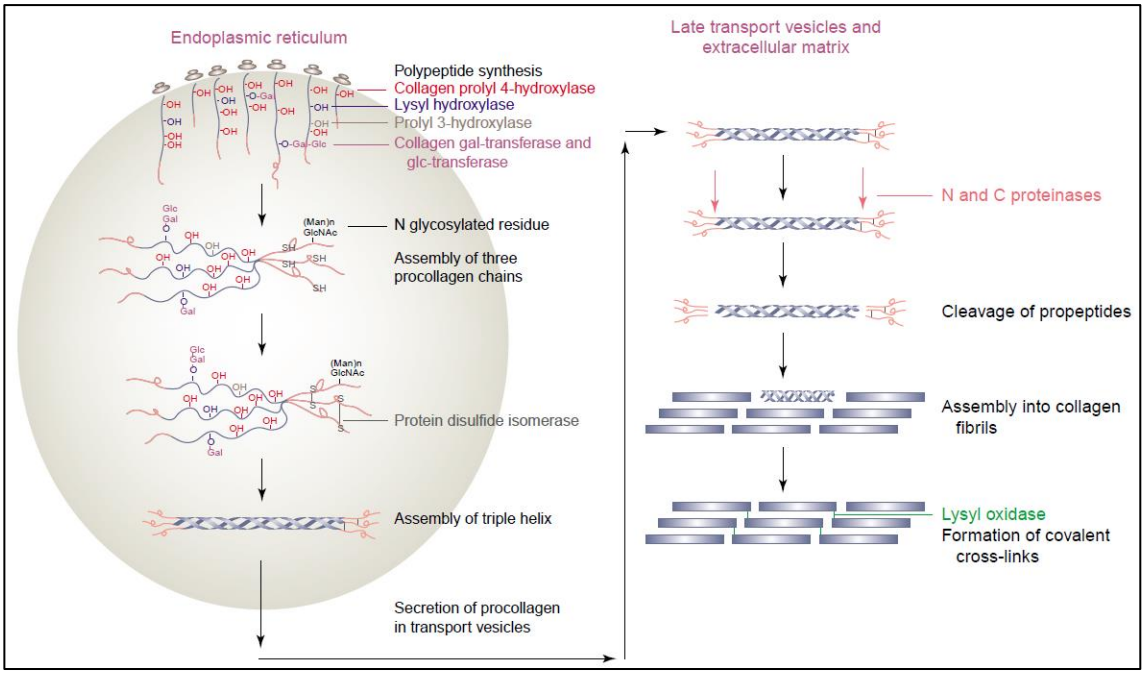


Figura 1. Principais passos pós-traducionais na síntese de colágeno (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004).

A molécula de colágeno possui dois aminoácidos exclusivos, a hidroxiprolina e hidroxilisina, que são formados pela hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina, respectivamente (MINOR, 1980; KOIDE; NAGATA, 2005). As posições X e Y da formula (Glicina-X-Y) são frequentemente ocupadas pelos

aminoácidos (2S)-prolina (Pro, 28%) e (2S, 4R)-4-hidroxiprolina (Hyp, 38%), respectivamente, embora qualquer aminoácido possa ocupar estas posições (SHOULDERS; RAINES, 2010). A trinca Glicina-Hyp-Pro é a mais comum em todos os tipos de colágeno (RAMSHAW; SHAH; BRODSKY, 1998). No animais, as unidades de tripla hélice de colágeno (procolágeno) se reúnem de forma hierárquica e complexa formando as fibras e redes macroscópicas observadas em tecidos, ossos e membranas basais (SHOULDERS; RAINES, 2010).

O colágeno é inicialmente sintetizado e secretado como proteína precursora maior, chamada procolágeno que possui um domínio helicoidal triplo central e não-colágeno em ambas as suas extremidades N- e C-terminais que são clivados no passo final da biossíntese do colágeno (KOIDE; NAGATA, 2005). A cadeia polipeptídica procolágeno (cadeias pro-α) encontra seus parceiros corretos formando diferentes tipos de procolágeno, em tripla hélice, num passo que envolve modificações pós-traducionais específicas, incluindo a isomerização cis-trans de muitas ligações peptídicas de prolil e hidroxiprolil (KOIDE; NAGATA, 2005; MYLLYHARJU, 2005).

O resultado deste complexo e coordenado processo é a síntese de diferentes subtipos de colágeno envolvendo transcrição de diferentes genes (BYERS, 2001). Dentre os subtipos de colágenos, os chamados formadores de fibrila, tipo I, II e III são os mais abundantes no organismo e estão presentes na pele, derme, ossos, tendões e ligamentos, córnea, vasos e órgãos cavitários (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

A natureza heteropolímera das macroestruturas de colágeno proporcionam mecanismos para uma diversidade ainda maior na construção da matriz extracelular, tornando desafiador a elucidação de alterações progressivas durante o desenvolvimento normal, reparação e regeneração de tecidos (BIRK; BRUCKNER, 2005), bem como na produção de biomateriais de colágeno, tanto para fins de estudos biológicos quanto terapêuticos (WALTERS; STEGEMANN, 2014).

Durante o desenvolvimento e regeneração tecidual, as moléculas de colágeno fornecem um dos caminhos que direcionam a organização tecidual, pois ligando-se a moléculas transmembranas, principalmente as integrinas, formam importantes sítios de adesão celular (BYERS, 2001).

2.2 Doenças genéticas do colágeno

Alterações congênitas no colágeno ou seus componentes na derme ou outros tecidos que se manifestam clinicamente em afecções no tecido conjuntivo estão compreendidas em várias doenças hereditárias (HOLBROOK; BYERS, 1982). Estas doenças podem se originar de mutações pontuais, deleções ou inserções nos genes responsáveis pela biossíntese das cadeias alfa e proteínas envolvidas nas modificações pós-traducionais (BYERS, 1989; BURROWS, 1999) e tem sido descritas em humanos (HOLBROOK; BYERS, 1982; BEIGHTON et al., 1998; BURROWS, 1999) e em animais domésticos (COUNTS et al., 1980; SOLOMONS, 1984; BROWN; YOUNG; CRIPPS, 1993; PACIELLO et al., 2003; WHITE et al., 2004).

Na medicina humana a afecção mais comumente descrita é a síndrome de Ehlers-Danlos (EDS), composta por um grupo de diferentes distúrbios que tem como característica em comum a fragilidade do tecido conjuntivo na pele (principalmente), e também em ligamentos, articulações, vasos sanguíneos e órgãos internos, com as variações dependentes do padrão de herança e alterações moleculares (BEIGHTON et al., 1998; BURROWS, 1999; DE PAEPE; MALFAIT, 2012; GHARBIYA et al., 2012).

Em animais este tipo de enfermidade é similar a mais de um subtipo de EDS e tem sido descrita como dermatoparaxis, EDS, hiperelastose cutânea e astenia cutânea (BECKER et al., 1976; NUSGENS et al., 1992; SEQUEIRA et al., 1999; WHITE et al., 2004).

A astenia cutânea em equinos foi identificada pela primeira vez no fim da década de 70 (LERNER & MCCRAKEN, 1978), mas só a partir do início do século 21 que foi demostrado o padrão de herança e identificação da mutação genética (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; TRYON et al., 2005; TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007). Por ter um forte impacto na indústria do cavalo a enfermidade é amplamente estudada a fim de diagnóstico para direcionamento dos acasalamentos (RASHMIR-RAVEN; HOPPER, R; RYAN, 2004; TRYON et al., 2007; BADIAL et al., 2014) e compreensão das alterações estruturais e metabólicas (GRADY et al., 2009; ISHIKAWA et al., 2012; RASHMIR-RAVEN et al., 2015).

2.3 Astenia cutânea regional hereditária em equinos (HERDA)

Após o primeiro relato da astenia cutânea em dois equinos da raça QM em 1978 (LERNER & MCCRAKEN, 1978) foram identificados equinos de outras raças com enfermidades semelhantes e que também apresentavam pele frágil e hiperextensível, sendo na década de 80 um cavalo da raça Puro Sangue Inglês (SOLOMONS, 1984), uma potra de dois anos de idade meio sangue Árabe (GUNSON, 1984), um potro Hanover (WITZIG et al., 1984), além de mais dois cavalos da raça QM (HARDY et al., 1988).

Em 2001 um novo relato descreveu lesões dérmicas profundas em padrão diferente numa potra QM de 1 ano de idade com hiperelastose cutânea e sugeriram o termo “separação dérmica zonaria” para os achados histopatológicos (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001).

Em 2004 pesquisadores avaliaram as alterações clínicas e imunohistológicas e os pedigrees, reforçando a hipótese do modelo de herança autossômica recessiva e sugeriram o nome de Astenia Dérmica Regional Hereditária Equina (HERDA) devido ao padrão de localização das lesões cutâneas (WHITE et al., 2004). Neste mesmo ano outros pesquisadores fizeram um estudo caso-controle, onde foram reunidos pedigrees de 90 animais QM afetados para hiperelastose cutânea e foi verificado um ancestral comum chamado “Poco Bueno” ou seu progenitor “King (AQHA 234)”, os pesquisadores observaram que animais que possuem qualquer um dos progenitores em sua genealogia possuem 58 vezes mais chance de desenvolver a doença (RASHMIR-RAVEN et al., 2004). Estes pesquisadores também verificaram que todos os 14 animais QM mais bem ranqueados na modalidade de apartação naquela época, são carreadores de uma cópia do gene mutado e como produziram grande número de descendentes com alto valor zootécnico e excelentes índices esportivos é possível que a frequência de novos casos de animais afetados aumentasse nas gerações futuras (RASHMIR-RAVEN et al., 2004).

Existem relatos de afecções de pele em equinos, semelhantes a HERDA, em animais das raças Paint Horse e Apaloosa (WHITE et al., 2004), meio sangue Árabe (GUNSON, 1984) e Warmblood (MARSHALL; SECOMBE; NICHOLLS, 2011). Todavia, a maior parte dos trabalhos descrevem os aspectos

clínicos, histopatológicos e moleculares na raça QM, principalmente nas linhagens utilizadas para as competições de rédeas e apartação, as chamadas “linhagens de trabalho” (WHITE et al., 2004; FINNO; SPIER; VALBERG, 2009; BADIAL et al., 2014b; RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015).

O primeiro relato de equinos com herda no Brasil foi em 2005, onde os autores descreveram três cavalos QM, com pele frágil que era facilmente esticada formando pregas que retornavam a posição anatômica de forma gradual e lacerava com facilidade, dois dos animais eram irmãos próprios e o terceiro era filho da mesma égua que os demais (BORGES et al., 2005). Além dos EUA e Brasil (WHITE et al., 2004; BORGES et al., 2005), enfermidade já foi descrita no Reino Unido (RENDLE; DURHAM; SMITH, 2008), Áustria (LITSCHAUER et al., 2010) e França (WHITE; BOURDEAU, 2011).

A frequência estimada de heterozigotos para a população de QM norte americana é de 3,5 %, sendo que para linhagens de apartação chega a 28,3% (TRYON et al., 2009). No Brasil foi investigado a frequência do alelo mutante em 690 animais QM, utilizados em quatro diferentes modalidades, e os autores observaram maior frequência de indivíduos carreadores na modalidade de Rédeas (9,8%), em seguida Apartação (7,5%), Corrida (0,9%), Tambor e baliza (0,8%), respectivamente (BADIAL et al., 2014b), sendo a frequência de carreadores para a população de QM no Brasil de 5,8% (BADIAL et al., 2014b).

Segundo dados do Stud Book da ABQM, o plantel brasileiro até janeiro/2017 era de 514.316 animais registrados com movimento em leilões da raça em todo o país, nos últimos cinco anos, de cerca de R$ 1 bilhão com a comercialização de aproximadamente 27 mil animais, pela média geral de R$ 37 mil (ABQM, 2017). Assim, pode-se estimar que existam mais de 29 mil animais carreadores, e consequentemente a possibilidade de vários animais afetados, refletindo em perdas diretas com animais afetados dentro do plantel nacional.

2.3.1 Etiopatogenia

A Herda em equinos é causada por uma mutação pontual (c.115G>A), no gene que codifica a Ciclofilina B (CypB), uma proteína da famílias das peptidilprolil isomerases (PPI) (KOIDE; NAGATA, 2005), ocasionando a troca de um resíduo de glicina por um de arginina no domínio N-terminal da CypB

(TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007), que por sua vez, leva a um efeito deletério no metabolismo do colágeno (BÄCHINGER, 1987; STEINMANN; BRUCKNER; SUPERTI-FURGA, 1991).

Uma das várias funções da CypB é a de isomerização cis-trans dos resíduos de prolina e estruturação da tripla hélice da molécula de colágeno (KOIDE; NAGATA, 2005). Foi demonstrado (*in vitro*) que a atividade PPI da CypB mutante é normal em células de cavalos afetados, porém a sua interação com outras proteínas (por exemplo: domínio P da Calreticulina e lisil-hidroxilase I), que são essenciais para o dobramento e secreção da molécula de colágeno tipo I, fica diminuída, além de apresentarem menores quantidades de modificações pós-traducionais dos resíduos de lisina (ISHIKAWA et al., 2012), evento que supostamente altera a organização do colágeno (KOZLOV et al., 2010).

As fibras de colágeno de áreas afetadas são mais finas, com fragmentação dos feixes de fibras, separados e com espaços entre os feixes (WHITE et al., 2004, 2007; BORGES et al., 2005).

Este desarranjo estrutural pode favorecer a ação de metaloproteinases de matriz (MMP), principalmente as colagenases, sobre o colágeno dérmico. Um estudo demostrou que a pele de animais afetados por HERDA é mais susceptível a ação de colagenase que a pele de cavalos normais (RASHMIR-RAVEN et al., 2015), o que reforça a hipótese de aumento na degradação da matriz extracelular dérmica por ação de MMP´s. Sabe-se que em humanos a exposição à radiação solar ocasiona ruptura da matriz extracelular da derme por MMP´s (RITTIÉ; FISHER, 2002).

2.3.2 Sinais clínicos e diagnóstico

Normalmente os primeiros sinais nos animais afetados aparecem a partir de um ano e meio de idade, quando são iniciados os trabalhos de doma e treinamento (HARDY et al., 1988; RASHMIR-RAVEN et al., 2004; WHITE et al., 2004; TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007), porém podem ser observados em animais antes dos seis meses de idade que se traumatizam (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; TRYON et al., 2005).

A enfermidade é caracterizada clinicamente pela presença de pele frouxa, hiperextensível, frágil e que lacera facilmente resultando em feridas

atróficas, hipertróficas ou ambas (LERNER, D. J.; MCCRAKEN, 1978; HARDY et al., 1988; BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; WHITE et al., 2004; BORGES et al., 2005). Ocasionalmente podem ocorrer animais afetados de forma mais branda que apresentam pele solta e hiperextensível que, mesmo não desenvolvendo lesões, podem apresentar sinais de dor e mudança de comportamento ao serem selados, tornando o diagnóstico clinico insidioso (RASHMIR-RAVEN, 2013).

Estudos demostraram que a pele de animais afetados possui maior quantidade de colágeno solúvel que cavalos normais (HARDY et al., 1988; GRADY et al., 2009) e menor módulo de elasticidade e resistência a tração em comparação com animais normais (GRADY et al., 2009; BOWSER et al., 2014). Além de ser mais solúvel, o colágeno da pele de animais afetados é desorganizado e menos unido que de animais normais (WHITE et al., 2004; GRADY et al., 2009; BADIAL et al., 2014a) e com isso mais susceptível aos efeito da degradação de colagenase (RASHMIR-RAVEN et al., 2015).

Embora a HERDA seja relatada inicialmente como uma doença de pele (WHITE et al., 2004), a enfermidade pode acometer outros tecidos do corpo dos cavalos afetados, incluindo a córnea, ligamentos e tendões, grandes vasos e estruturas cardíacas (GRADY et al., 2009; MOCHAL et al., 2010; BOWSER et al., 2014; BADIAL et al., 2015).

O diagnóstico presuntivo pode ser feito com base no histórico, sinais clínicos, avaliação do pedigree e avaliação dermatológica observando as alterações histopatológicas (RASHMIR-RAVEN et al., 2004).

Achados histopatológicos e alterações ultraestruturais da pele de animais com HERDA podem ser úteis no diagnóstico (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; WHITE et al., 2004; BORGES et al., 2005), porém, não devem ser utilizados de maneira isolada, uma vez que podem ser de difícil interpretação e não conclusivos (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; BORGES et al., 2005; WHITE et al., 2007). Estudos demonstraram que a habilidade dos patologistas difere na capacidade de identificação de alterações, confirmando que a interpretação das biópsias deve ser feita por profissionais experientes (WHITE et al., 2004; BADIAL et al., 2014a; RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015).

Para o diagnóstico definitivo é necessário a presença da mutação pontual em homozigose no gene codificante da CypB (c.115G>A) (TRYON;

WHITE; BANNASCH, 2007). O diagnóstico diferencial deve realizado, pois traumas em animais não afetados podem gerar feridas com características parecidas com as observadas em animais afetados, todavia, sem a presença de pele hiperextensível, frouxa e cicatrizes anormais (RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015). Doenças similares também entram na lista de diagnósticos diferenciais, como por exemplo a Síndrome da Fragilidade Cutânea Equina (MONTHOUX et al., 2015), que é uma variação da EDS, porém, não foi relatado em cavalos da raça QM. Do mesmo modo, a epidermólise bulhosa juncional relatada em neonatos de raça Belga (KOHN et al., 1989) e Sela Americana (LIETO; SWERCZEK; COTHRAN, 2002; GRAVES; HENNEY; ENNIS, 2009).

2.3.3 Tratamento, prognóstico e manejo

Devido ser um problema hereditário não existe cura, até o momento, para a enfermidade e, sendo assim, o tratamento baseia-se no princípio de manutenção da qualidade de vida de animais acometidos (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; BADIAL et al., 2013). É necessário evitar agentes cáusticos na limpeza das feridas, drenar hematomas e ter cautela com padrões de suturas, uma vez que estas normalmente não são bem sucedidas na pele de animais afetados (RASHMIR-RAVEN, 2013). Suplementos podem ser utilizados como adjuvantes metabólicos. Em uma recente revisão, os autores sugerem o uso de vitamina C, pois esta é um cofator na produção de colágeno, além de nutracêuticos a base de lisina, condroitina e glicosamina (RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015), com base em estudos em humanos com EDS (CASTORI, 2012).

O prognóstico depende da condição clínica em que o animal se encontra. Animais ligeiramente afetados podem ser montados e se bem cuidados podem viver durante anos (RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015). Todavia, animais acometidos que apresentam extensas lesões não podem ser montados e muitos são sacrificados devido a gravidade das lesões e problemas secundários que levam ao sofrimento (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; WHITE et al., 2007; GRADY et al., 2009).

Animais afetados devem ser afastados da reprodução para diminuir a ocorrência da enfermidade, no entanto fêmeas podem ser utilizadas com

receptoras de embrião, pois animais afetados não apresentam problemas no sistema reprodutivo (WHITE et al., 2007).

Fatores ambientais como incidência e radiação solar e temperatura podem contribuir para piora do quadro clinico. Devido as lesões serem mais comuns na região dorsal (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; RASHMIR-RAVEN et al., 2004; WHITE et al., 2004), onde a incidência de radiação e o calor são mais intensos, os animais afetados devem ser mantidos protegidos do sol, pois sugere-se uma melhora na condição clínica de diminuição da severidade das feridas cutâneas (RASHMIR-RAVEN, 2013).

Os danos causados pela radiação da luz solar na pele de equinos com HERDA é atribuído como fator de risco a incidência de feridas na região dorsal nos animais afetados, área supostamente mais exposta ao sol (RASHMIR-RAVEN et al., 2015), hipótese que estes pesquisadores sugeriram com base em trabalhos que demonstram aumento da atividade de metaloproteinases de matriz em pele humana exposta a radiação solar simulada (LAHMANN et al., 2001; BRENNAN et al., 2003).

2.4 Metaloproteinases de matriz (MMP)

A primeira MMP foi descrita na década de 60, onde foi demonstrado a ação enzimática da colagenase intersticial (MMP-1) na degradação da tripla hélice de colágeno durante o fenômeno da metamorfose da cauda de um girino (GROSS; LAPIERE, 1962).

As MMP´s constituem uma grande família de enzimas que tem a finalidade de degradar vários componentes da matriz extracelular (MEC) (NELSON; FINGLETON; ROTHENBERG, 2000; CAWSTON; WILSON, 2006), possuindo 23 proteases distintas em humanos, conforme demonstrado na Tabela 1 (KLEIN & BISCHOFF, 2011). São proteinases zinco/cálcio dependentes que tem fundamental importância na degradação da MEC, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos da remodelação tecidual (STERNLICHT; WERB, 2001; MOTT; WERB, 2004). Todavia, em condições inflamatórias ou malignas destrutivas dos tecidos, a síntese, secreção e

atividade de MMP´s são reguladas anormalmente, conduzindo a danos não controlados nos tecidos (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999).

Embora várias MMP's estejam expressas na pele de mamíferos, apenas três tem atividade colagenolítica (colagenases), a MMP1 (colagenase intersticial), MMP8 (colagenase neutrofílica) e MMP13 (colagenase 3), podendo degradar colágeno fibrilar tipo I e III (BRENNAN et al., 2003).

Tabela 1. Visão geral de 23 Metaloproteinases de Matriz (MMP) identificadas em humanos e seus respectivos nomes comuns. Adaptado de Klein & Bischoff (2011).

MMP	Nome alternativo
1	Colagenase 1, Colagenase Intersticial
2	Gelatinase A, colagenase tipo IV 72-kDa
3	Estromelisina 1, Transina 1
7	Matrilisina, PUMP 1
8	Colagenase 2, Colagenase Neutrofílica
9	Gelatinase B
10	Estromelisina 2
11	Estromelisina 3
12	Metalo-elastase Macrofágica
13	Colagenase 3
14	MMP de membrana tipo 1
15	MMP de membrana tipo 2
16	MMP de membrana tipo 3
17	MMP de membrana tipo 4
19	Nenhum
20	Enamelisina
21	Nenhum
23	MMP Matriz de Cisteína, Femalisina, MMP22
24	MMP de membrana tipo 5
25	MMP de membrana tipo 6, Leucolisina
26	Matrilisina 2/endometase
27	Nenhum
28	Epilisina

Mesmo que estudos tenham demonstrado aumento da expressão de outras MMP´s, além das colagenolíticas, induzido pela radiação ultravioleta (UV) na pele de humanos (KAWAGUCHI et al., 1996; FISHER et al., 1997; FISHER; VOORHEES, 1998) a MMP1 parece ser a protease que causa maior dano ao colágeno cutâneo no processo de fotoenvelhecimento (BRENNAN et al., 2003), tendo sua máxima expressão com 24 horas de exposição da pele à radiação solar (LAHMANN et al., 2001). Todavia, a MMP1 é pouco expressa na pele de tecido cicatricial hipertrófico em humanos (ETO et al., 2012).

Tanto em humanos quanto em ratos as MMP1 e MMP13 são encontrados em diversos tecidos e tem fundamental importância na migração de queratinócitos basais da derme (MADLENER; PARKS; WERNER, 1998; GRENACHE et al., 2007; HATTORI et al., 2009). A MMP-8 é uma colagenase expressa predominantemente por neutrófilos e sugere-se que tenha papel no processo de reepitelização da pele em modelos murinos (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2007), porém sem atuação no processo de migração dos queratinócitos (PIRILÄ et al., 2003).

Em equinos, foi observado que a MMP13 é mais expressa em casos de tendinite dos flexores digitais quando comparado a animais normais (NOMURA et al., 2007) e também em tecido laminar de equinos com laminite induzida por sobrecarga de carboidratos (WANG et al., 2014).

2.5 Ação da radiação solar na matriz extracelular cutânea

A radiação solar total é a quantidade de energia emitida pelo Sol, transmitida na forma de radiação eletromagnética, que durante vários anos foi considerada uma constante (1.365 W/m^2), entretanto, após várias observações, desde o final da década de 70, foi demonstrado que existe variação em escalas de tempo (FROHLICH, 2006).

Radiação eletromagnética ocorre em diferentes faixas espectrais classificadas em diferentes regiões do espectro luminoso: Raios-γ, Raios-X, Ultravioleta (UV), Visível, Infravermelho, Micro-ondas ou Ondas de rádio (GÓMEZ et al., 2018). A radiação UV é composta por comprimentos de onda consideradas longas, UVA com 320-400nm, e curtas, UVB com 290-320nm e

UVC com 100-290nm. No entanto, os espectros capazes de atingir a superfície terrestre e causar danos a pele são UVA e UVB (Figura 2), sendo que aproximadamente 95% da radiação UV que atinge a superfície terrestre é composta por UVA e 5 % UVB, a radiação UVC é absorvida pelas camadas atmosféricas (WANG et al., 2019).

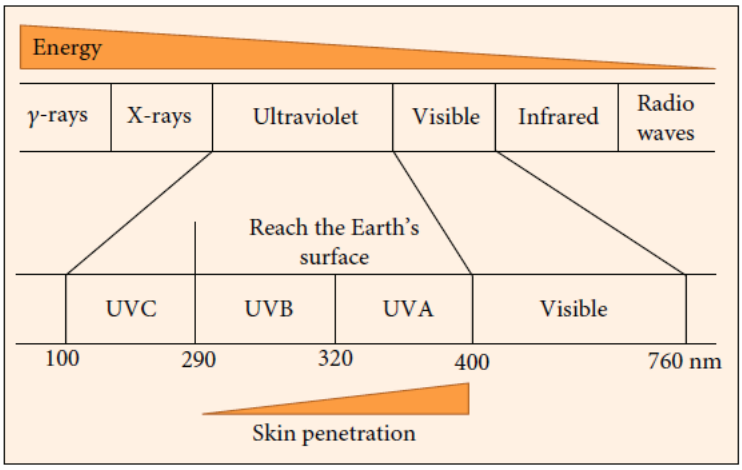


Figura 2. Componentes do espectro eletromagnético da radiação solar total, com potencial de energia e capacidade de penetração na pele humana. Adaptado de: Wang et al. (2019).

O envelhecimento da pele é um evento complexo, altamente coordenados por eventos fisiológicos naturais e pelo fotoenvelhecimento mediado pela radiação solar (WANG et al., 2019). Uma vez iniciado o fotoenvelhecimento, as fibras colagens começam a ser degradadas, a pele consequentemente começa ficar enrugada, a pigmentação cutânea ocorre por proliferação anormal de melanócitos, aumento da atividade de MMP e degradação da matriz extracelular, além de infiltrados inflamatórios e ectasia vascular (YAAR & GILCHREST, 2007).

Na década de 90 pesquisadores observaram, em humanos, que a radiação solar afeta colágenos tipo I e tipo III na derme (TALWAR et al., 1995) e que raios ultravioletas do tipo B (UVB) interferem na expressão de MMP1 da pele (FISHER et al., 1996).

Fisher e colaboradores (1997) investigaram os efeitos da radiação ultravioleta na pele de humanos hígidos, aonde foi determinado a quantidade de 1,49 X 10^{-3} W/cm^2 de luz ultravioleta artificial, necessária para causar uma reação eritematosa mínima (MED – *Minimal Erythema Doses*) 24 horas após a

exposição. Segundo estes autores, essa dose corresponde à uma exposição de 5 a 15 minutos ao sol do meio dia, e foi o suficiente para aumentar a expressão gênica de MMP1 na epiderme e derme em até quatro vezes, e degradação de colágeno tipo I, 24 horas após exposição e se mantendo até 72 horas.

Outro estudo de expressão gênica, pesquisadores utilizaram PCR em tempo real para avaliar os efeitos da radiação solar simulada (*SSR – Solar Simulated Radiation*) na regulação de MMP1 e também de inibidor tecidual de MMP´s (*TIMP – Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) na epiderme e derme, separadamente. Para tal, utilizaram biópsias de pele de humanos 24 horas após terem sidos irradiados por SSR e observaram que foram necessárias as quantidades de 1 MED para induzir e 2 MED para que houvesse o pico de expressão de MMP1, respectivamente, não havendo diferenças entre epiderme e derme, já TIMP-1 foi expressa apenas na derme (LAHMANN et al., 2001).

Fisher e colaboradores (2001) avaliaram expressão gênica e proteica, além de atividade enzimática de MMP1 e MMP8 na pele de humanos irradiada com UV e verificaram maior quantidade relativa de mRNA e proforma proteica de MMP1 em amostras irradiadas com 2 MED de UV até 24 horas pós tratamento, além disto, apesar de não detectarem expressão gênica de MMP8, observaram, em testes de imunofluorêscencia, um aumento na expressão proteica de uma proforma da enzima em tecido com infiltração neutrofílica de quatro a oito horas pós radiação UV na derme e até 24 horas pós radiação em epiderme.

Já em um estudo de expressão proteica e atividade enzimática das MMP´s 1 e 13, utilizando as técnicas de *Western blotting* e Zimografia, respectivamente, Brennan e colaboradores (2003) observaram um aumento de 10 vezes na expressão de MMP1 em cultura de celulas de pele tratada com 2 MED de SSR (UVB) e que pelo menos 50% da enzima MMP1 estava na forma ativa em cultura de células de pele, 72 horas após exposição. Estes autores também verificaram que não houve influência da radiação solar na expressão de MMP13, confirmando a maior importância da MMP1 no processo de degradação da matriz extracelular dérmica.

2.5 Justificativa

Diante da hipótese que a pele de equinos acometidos por HERDA é mais susceptível a ação de colagenase (RASHMIR-RAVEN et al., 2015) e que a radiação solar pode aumentar a ação de MMP´s no colágeno dérmico descrita em humanos (RITTIÉ; FISHER, 2002; BRENNAN et al., 2003) houve a pretensão de investigar a expressão gênica de colagenases endógenas na matriz extracelular da derme de equinos acometidos por HERDA, conhecimento que pode contribuir com o manejo dos animais afetados e melhor compreensão da enfermidade.

3. OBJETIVO

Avaliar a influência da radiação solar na expressão gênica de colagenases na pele de equinos afetados por HERDA de acordo com o grau de exposição à radiação solar.

3.1 Objetivos específicos

Observar se ocorrem diferenças entre a expressão gênica das MMP´s 1, 8 e 13 na pele de cavalos afetados por HERDA e normais, ao longo do tempo, quando protegidos e expostos a radiação solar.

Comparar a expressão gênica das MMP´s em regiões da pele que são mais e menos expostas à radiação solar (região dorsal e ventral, respectivamente), bem como se existem diferenças entre os grupos de equinos afetados e normais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Esta pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu sob o protocolo n° 0026/2017.

Foram utilizados 12 equinos da raça quarto de milha, quatro fêmeas e oito machos, pesando em média 331,4±51,3 Kg, divididos e dois grupos experimentais: Grupo afetado (GA) contendo seis animais positivos para o teste genético (TRYON et al., 2007), sendo quatro machos e duas fêmeas (três animais com pelagem Alazão, dois Baios e um Castanho) com média de peso e idade para o GA de 333,17±53,49Kg 9±5,4 anos, respectivamente; Grupo Controle (GC) com seis animais hígidos, sendo quatro machos e duas fêmeas (três animais com pelagem Alazão, dois Baios e um Castanho), com média de peso e idade para o GC de 329,67±54,20Kg e 10,3±5,5 anos, respectivamente.

4.2 Delineamento experimental

Esse trabalho foi baseado em um experimento casualizado do tipo caso/controle, onde os dois grupos experimentais foram submetidos ao mesmo tratamento e momentos de colheita das amostras.

O tratamento consistiu em submeter ambos os grupos de animais a uma fase de restrição e posteriormente uma fase de exposição à luz solar (Figura 3), todo período do experimento ocorreu entre os meses de dezembro/2017 e janeiro/2018.

No período de restrição, todos os animais foram mantidos em baias individuais, protegidos integralmente da luz solar, durante 30 dias. Após o período de restrição, todos os animais foram mantidos em piquetes abertos, aos pares (afetado e normal), sem qualquer proteção contra radiação solar, em período integral. Em todas as etapas, a radiação solar foi aferida com aparelho portátil[1], segundo as instruções do fabricante. Em ambas as etapas todos receberam feno de gramínea *Coast cross* e água *ad libidum*, além de suplementação com concentrado e sal mineral.

[1] MES-100. INSTRUTHERM Instrumentos de Medição Ltda. São Paulo - SP.

As colheitas das amostras ocorreram em seis momentos, ao longo do período de tratamento: M0, previamente a fase de restrição ao sol; M1, aos 15 dias de restrição à radiação solar; M2, 30 dias de restrição à radiação solar; M3, ao fim do primeiro dia de exposição à radiação solar; M4, final do terceiro dia de exposição à radiação solar; M5, ao 15º dia de exposição solar (Figura 3).

Em M3 e M4 a radiação solar foi aferida no dorso e no ventre dos animais, para observar uma provável diferença na quantidade de radiação que cada região é exposta.

4.3 Colheita das amostras

Foram realizadas biopsias de pele de regiões do dorso e do ventre de todos os animais, mantendo a lateralidade para todos os momentos de colheita, sendo que foi utilizado o lado com região de pele mais integra nos animais afetados, pois alguns animais apresentavam cicatrizes de pele, e mantido o mesmo lado nos respectivos animais controles. Foi mantida uma distância de, pelo menos, 20 cm entre os pontos de biópsia nas seguintes regiões: paramediana à coluna vertebral, 10 cm da linha média dorsal, das regiões da cernelha e 15ª vertebra torácica para amostras de dorso; paramediana, cinco cm da linha média ventral, das regiões external, umbilical e púbica. Foram determinadas essas regiões devido a espessura da pele ter menor variância (BADIAL et al., 2014a).

4.3.1 Biópsias de pele

Foi utilizada biópsia incisional para colheita de pele íntegra (2,0 cm X 1,0 cm) realizadas após sedação dos animais com cloridrato de detomidina[2] na dose de 0,02 $mg.kg^{-1}$ IV e anestesia local SC com lidocaína 2%[3] , em padrão L invertido, com distancia de cinco cm do ponto de biopsia, foi realizada limpeza da pele com solução salina, afim de diminuir possíveis contaminantes da amostras. Todas as amostras foram congeladas imediatamente pós colheita em

[2] DormiunV® - AGENER UNIÃO Saúde Animal - São Paulo, SP.
[3] Xylestesin®; Cristália, São Paulo, SP.

nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a - 80 ºC para os testes moleculares.

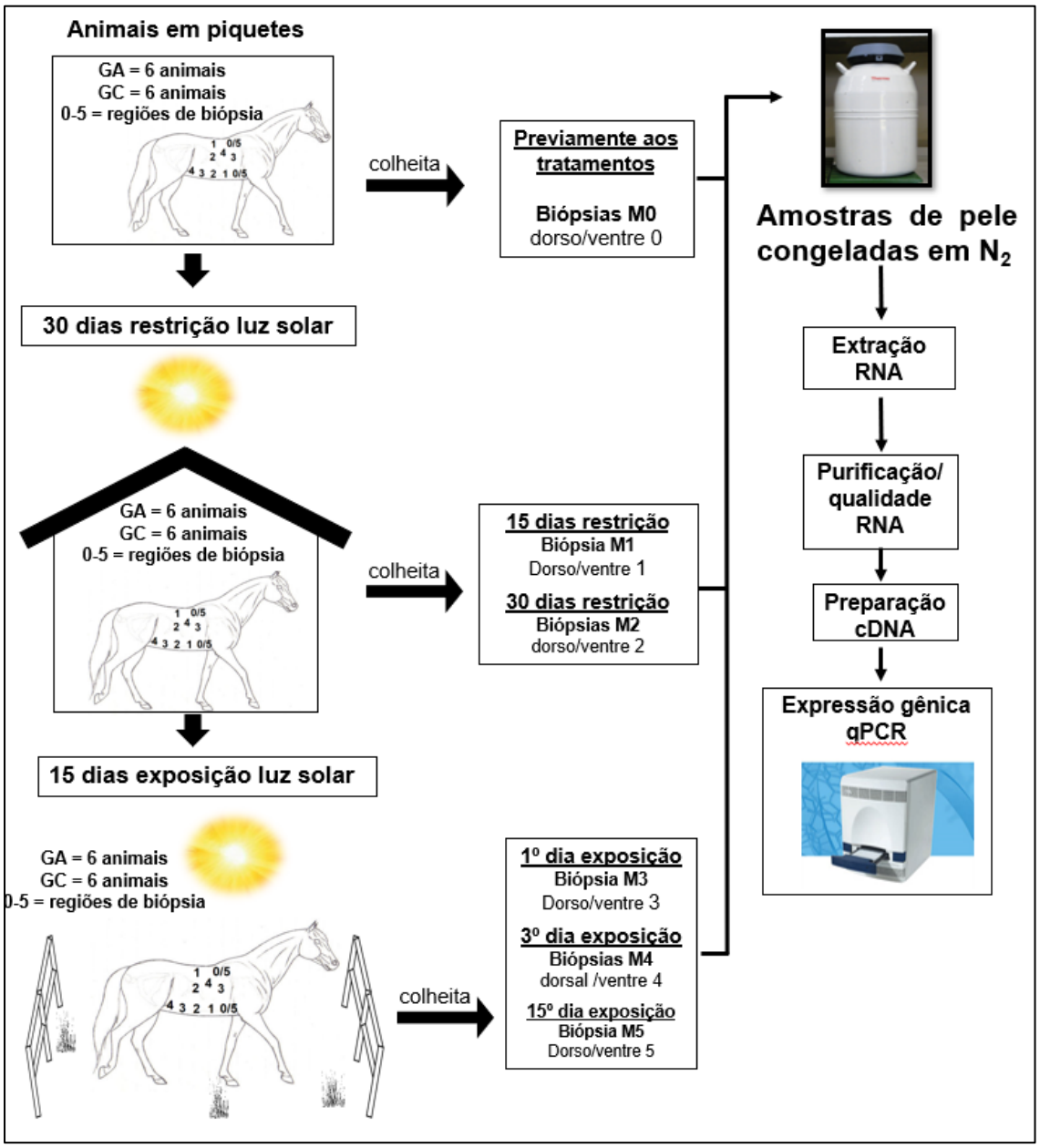


Figura 3. Desenho experimental demonstrando os pontos determinados para realização das biópsias em cada momento (0 a 5, no dorso e ventre de cada animal), o esquema de restrição e exposição à radiação solar que os grupos de animais foram submetidos, além do esquema de procedimentos para as análises em laboratório.

4.4 Análise da expressão gênica das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Todas as análises de qPCR foram realizadas nos laboratórios de biologia molecular da clínica veterinária da FMVZ/UNESP de Botucatu e do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP de Botucatu.

4.4.1 Extração e purificação de RNA total

Para extração e purificação do RNA das amostras de pele foi utilizado kit comercial [4]. As amostras congeladas foram fracionadas em alíquotas pesando 50 mg de pele, seccionadas de forma transversal, contendo todas as camadas (epiderme e derme). Para maceração do tecido foram utilizados tubos plásticos de 2 mL com esferas de cerâmica[5] onde foram acondicionados os fragmentos de pele juntamente com 300 µL de tampão de lise contendo 2-mercaptoetanol[4] e a maceração ocorreu em homogeneizador automático (Precellys® 24)[6] à 6.500 RPM em três ciclos de 30 segundos de agitação com intervalos de 30 segundos. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para tubos com 350 µL de solução tampão de diluição (Blue)[4], homogeneizadas gentilmente de forma manual e incubadas a 70ºC durante três minutos, após foram centrifugadas por 10 minutos à 12.000 x g em temperatura ambiente.

O conteúdo lisado foi transferido para tubo plástico de 2 mL, adicionado 200 µL de etanol 95% e homogeneizado gentilmente por pipetagem, o conteúdo foi transferido para colunas acondicionadas em tubos coletores e centrifugadas à 12000 x g durante 60 segundos. O conteúdo do tubo foi desprezado, a coluna foi novamente acondicionada no tubo coletor e 600 µL de solução de lavagem[4] foi adicionada a coluna, uma nova etapa de centrifugação foi realizada à 12.000 x g durante 60 segundos.

Nesta etapa as amostras (ainda nas respectivas colunas de purificação) foram submetidas a tratamento com 50 µL do mix de DNase (fornecido no kit), adicionadas diretamente na membrana das colunas, e incubadas durante 15

[4] SV total RNA Isolation System – PROMEGA Corporation Madison, WI 53711-5399 USA
[5] Tissue grinding CKMix50-R - Bertin-technologies, Rockville, MD 20850, USA.
[6] Precellys® 24 - Bertin-technologies, Rockville, MD 20850, USA. ,

minutos a temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 200 µL de solução de bloqueio da reação. Esta etapa é imprescindível para eliminar qualquer molécula de DNA que possa contaminar as amostras e produzir reações inespecíficas na etapa de qPCR.

Após tratamento com DNase as colunas receberam 600 µL de solução de lavagem e centrifugadas a 12000 x g durante 60 segundos, uma segunda etapa de lavagem das colunas foi realizada com 250 µL de solução de lavagem e centrifugadas a máxima velocidade (16.000 x g) durante 120 segundos. A fim de garantir que o todos os restos de tampões fossem eliminados uma nova etapa de centrifugação a 12.000 x g durante 60 segundos foi realizada com as colunas em novos tubos coletores.

Para a eluição do RNA purificado, as colunas foram então transferidas para novos tubos plásticos de 1,5 mL, foi adicionado 100 µL de H_2O NF (água ultrapura livre de nucleases) diretamente na membrana das colunas e uma nova etapa de centrifugação foi realizada a 14000 x g durante 60 minutos.

A pureza e quantificação do RNA extraído foi realizado em espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000)[7], com base na relação de absorbância A260nm: A280nm e da leitura a A230nm. O grau de pureza relativo à presença de contaminantes proteicos foi obtido pelo cálculo do quociente A260nm: A280nm, onde uma razão compreendida entre 1,8 e 2,0 foi o indicador de qualidade. Após as amostras foram armazenadas à -80ºC para posterior reação de transcriptase reversa e confecção do DNA complementar (cDNA).

Uma amostra de pele de um equino foi utilizada como padrão, tanto na fase de testes e padronização das concentrações dos *primers* quanto na construção das curvas padrão para análise da eficiência na reação de qPCR, o RNA extraído desta amostra padrão foi analisada quanto a sua pureza no equipamento 2100 Bioanalyzer[8], onde a amostra foi aplicada em um chip com uma matriz de gel, contendo uma mistura de fluoróforo e marcador de peso molecular. A ligação do fluoróforo ao marcador e ao RNA resulta em fluorescência que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico

[7] Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Delaware, EUA
[8] 2100 Bioanalyzer Instrument – Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA 95051, USA.

18S e 28S e a atribuição de m score de integridade (RIN, do inglês, *RNA integrity number*), que varia de 1 a 10, sendo considerado íntegro amostra com score ≥7.

4.4.2 Reação da Transcriptase Reversa e produção de cDNA

A reação de transcrição reversa do RNA para confecção do cDNA foi realizada utilizando o RNA purificado e tratado com DNase e o sistema de transcriptase reversa ImProm-II™[9], segundo recomendações do fabricante. Para tal, foram utilizados 800ng de RNA total, 1,5µg de *random primers* e H_2O NF qsp para 15 µL, esse mix foi submetido a incubação à 70ºC durante cinco minutos e em seguida inserido em gelo por mais cinco minutos, esse choque térmico garante que os *random primers* não se anelem entre si até o momento em que o mix contendo a enzima transcriptase reversa seja adicionado.

Para o preparo do mix da enzima foram utilizados 12µL de tampão da enzima, 12µL de $MgcL_2$, 3µL mix dNTP´s, 1,5µL de RNAsin, 3µL de transcriptase reversa e H_2O NF qsp para volume de 45µL. O mix da enzima foi adicionado ao mix da amostra totalizando um volume final para a reação de 60µL. a reação da Transcriptase reversa ocorreu em termociclador, sob as seguintes condições: anelamento a 25ºC durante 5 minutos, extensão à 42ºC durante 60 minutos, inativação da enzima à 85ºC durante 3 minutos e resfriamento à 4ºC. Em seguida os produtos da reação foram armazenados à -20°C.

4.4.3 Desenho dos iniciadores (*primers*)

A sequência genômica dos primers para os genes alvos (MMP1, MMP8 e MMP13 equinos) e normalizadores (β-actina e GAPDH equinos) foram obtidas com auxílio de ferramenta disponível na internet (www.ncbi.nlm.nih.gov) e as sequências dos *primers* específicos para genes alvo e normalizadores foram gerados por meio da utilização da ferramenta online PRIMER-BLAST disponível na plataforma do NCBI. As sequências dos iniciadores dos genes alvo e endógeno utilizados possuíam entre 20 e 23 pares de base (pb) e temperatura de hibridização entre 59 e 64ºC e estão dispostos na Tabela *2* 2. A especificidade de cada conjunto de primers, para ambos os genes, foi verificado com o auxílio

[9] ImProm-II™ Reverse Transcription System - Promega Corporation. Madison, WI 53711-5399 USA.

do programa BLAST disponível no website do NCBI. Todos os conjuntos de primers utilizados foram desenhados em posições exon-exon (Figura 4), ou seja, os produtos amplificados ocupam posições de um *exon* a outro, isso faz com que diminua a chance de amplificação de moléculas de DNA, pois estas são compostas por *exons* e *introns.*

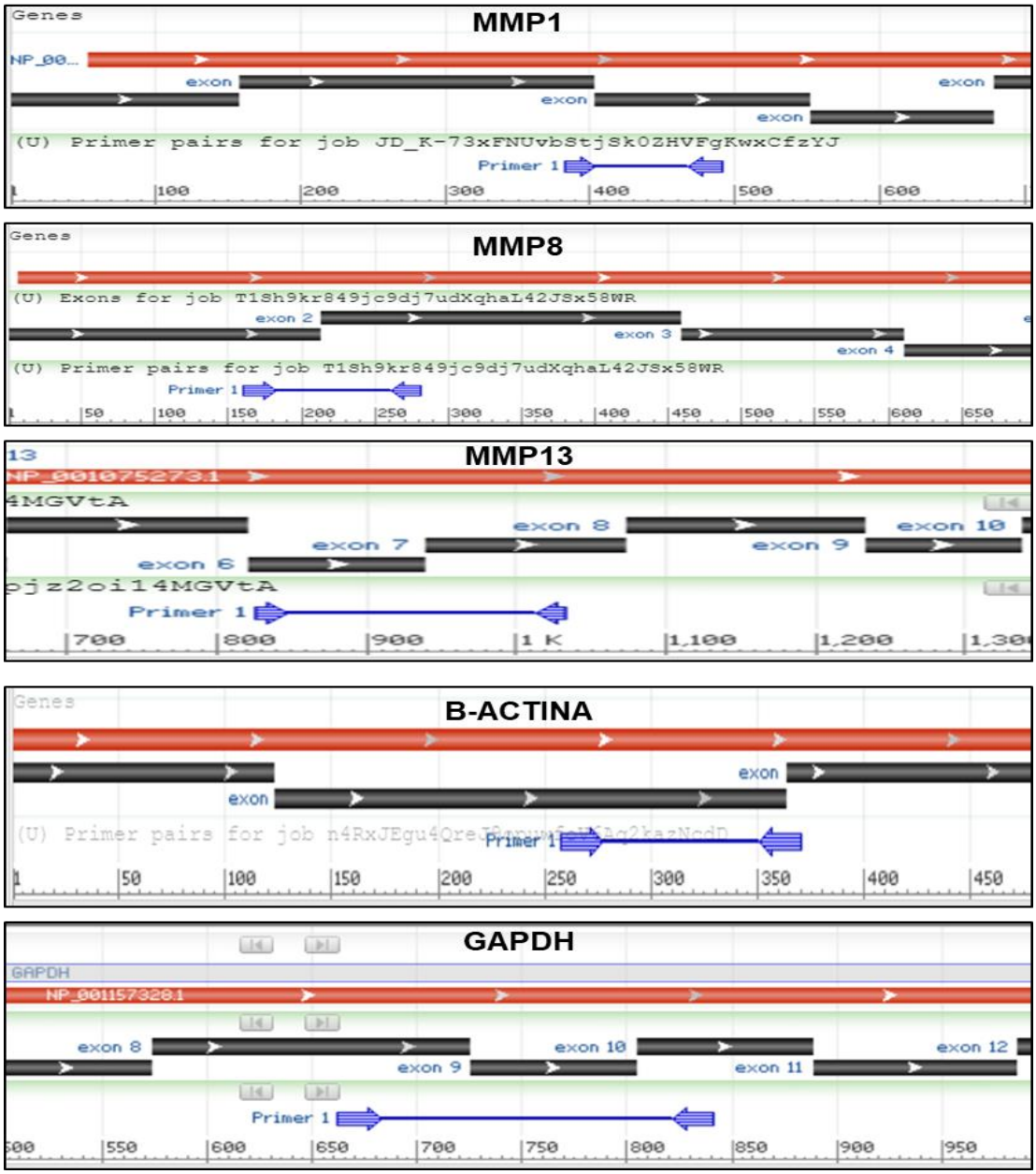


Figura 4. Desenho esquemático demonstrando a posição dos conjuntos de primers e seus respectivos produtos amplificados em relação ao gene (vermelho) e a posição das junções exon-exon (degraus em preto). Primers são representados pelas setas azuis e entre cada seta os produtos amplificados.

Tabela 2. Sequência dos conjuntos de *primers* dos genes alvo (MMP1, MMP8 e MMP13 equino) e endógenos (β-actina e GAPDH equina) utilizados na reação de qPCR. O número de acesso corresponde a sequência do RNAm para os respectivos genes no banco de dados do NCBI.

Nº acesso NCBI	Nome do primer	Sequência gênica (5'->3')	Produto (pb)
NM_001081847.2	MMP1 Foward	GAACACACACCTGACCTACAG	108
	MMP1 Reverse	GGTGAGACATTACTCCAGAGTTG	
XM_005611538.2 (x1) e XM_001498836.3 (x2)	MMP8 Foward	CCTTTCCAGTACCTCCTGAATC	121
	MMP8 Reverse	CTAGTGCTGTTCTTCCTTGC	
NM_001081804.1	MMP13 Foward	GGAGATGAAGACCCGAACCC	207
	MMP13 Reverse	GGCAGCATCAATACGGTTGG	
NM_001081838.1	β-actina Foward	GCACCACACCTTCTACAACG	113
	β-actina Reverse	ACATGATCTGGGTCATCTTC	
NM_001163856.1	GAPDH Foward	ACATCATCCCTGCTTCTACTG	180
	GAPDH Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	

4.4.4 Avaliação dos conjuntos de *primers* por PCR convencional e sequenciamento Sanger

Os conjuntos de *primers* utilizados foram avaliados, quanto sua especificidade, pela técnica de PCR convencional onde foram utilizados 2µL de cDNA, 400nM de *primer foward* e *reverse*, 10µL de GoTaq® Master Mixes[10] e H_2O NF qsp para 25µL de volume final para reação. Após, foi utilizado 10µL do produto da reação, onde as amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese[11] gel de agarose 1,5% corado com GelRed™[12] quanto ao posicionamento das bandas e comparados com um marcador de peso molecular[13]. As amostras amplificadas foram purificadas com um kit comercial[14], segundo recomendações do fabricante, e após 10µL de produto de PCR purificado juntamente com 5µL de cada respectivo iniciador (*foward* e *reverse*) foram submetidos ao sequenciamento usando kit comercial[15] e o sequenciador ABI 3500 *Genetic Analyzer* [16]. Após o sequenciamento, o controle de qualidade

[10] Gotaq® PCR Master Mix - Promega Corporation, Madison, WI 53711 USA.
[11] Major Science, Saratoga, CA, USA.
[12] Biotium, Halward, CA, USA.
[13] Mini Sizer 50BP DNA Ladder – NORGEN Biotek Corp. Thorold, ON, Canada.
[14] NucleoSpin® Gel and PCR clean-up - Macherey-Nagel®, Duren, Alemanha.
[15] BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA.
[16] ABI 3500 Applied Biosystems - Foster City, Califórnia, EUA.

das sequencias e dos eletroferogramas obtidos foi realizado utilizando o software MEGA-X 1.01[17].

4.4.5 Análise especificidade e concentração dos *primers* e eficiência da reação qPCR

Mesmo após ter sido realizada a análise de especificidade dos iniciadores pelas técnicas de PCR convencional e sequenciamento Sanger, os primers foram testados quanto a sua especificidade e concentração ideal para a reação no equipamento de qPCR, onde a concentração que produziu uma curva de dissociação (*melting)* com pico único foi utilizada nas reações de expressão gênica. A curva de dissociação consiste em aumentar a temperatura de forma a quebrar as pontes de hidrogênio que ligam as duas fitas do cDNA e liberar o fluoróforo responsável pelo sinal de fluorescência, diminuindo este sinal à medida que aumenta a temperatura. Assim, quando se observa somente um pico de fluorescência em determinada temperatura significa que o primer amplificou um produto específico.

Para determinar a concentração ideal de cada conjunto de primers foram realizadas reações de qPCR utilizando 02 µL de cDNA produzido a partir de RNA total extraído da pele de um equino (sob as mesmas condições de colheita e extração supracitadas), concentração de cada iniciador que variou de 100 nM até 400 nM, 10 µL do master mix da enzima de qPCR e H_2O NF qsp para 20 µL de volume final para reação. Foi escolhida a concentração que produziu menor sinal inespecífico na curva de dissociação.

Uma vez escolhida a melhor concentração para os conjuntos de *primers* foi realizada a análise da eficiência da reação de qPCR, para cada gene foi utilizado uma diluição seriada (10 x) de 10^{-0} até 10^{-5} de cDNA construído a partir de RNA extraído de uma amostra de pele inflamada de equino para construção de curvas padrão a partir de: 02µL de cDNA (cada diluição); 300nM de *primers foward* e *reverse* do gene alvo MMP1 e dos genes endógenos β-actina e GAPDH; 400nM de cada iniciador (*foward* e reverse) para os genes alvos MMP8 e MMP13; 10µL de Gotaq® qPCR master mix[19] e H_2O NF qsp para 20µL de

[17] MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics The Pennsylvania State University University Park, PA 16802 USA.

volume final para reação. Para todos os alvos e cada diluição utilizou-se três replicas técnicas. As condições das reações foram: 95ºC por 10 minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos de: 95ºC por 15 segundos, 60ºC durante 60 segundos para amplificação, seguido da curva de dissociação.

4.4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica das colagenases foi realizada utilizando o método de quantificação relativa, onde foi utilizado o ΔcT ($cT_{gene\ alvo} - cT_{gene\ endógeno}$) das amostras de dorso no M0 como referência para se obter o $\Delta\Delta$cT utilizado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A escolha do gene endógeno (normalizador ou *housekeeping*) foi realizada com base no método 2^{-cT} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), o coeficiente de variação, para cada momento, foi a medida utilizada na escolha do gene endógeno mais adequado para o cálculo do ΔcT, ou seja, o que sofreu menor variação ao longo do período de tratamento (restrição/exposição à radiação solar). As amostras foram analisadas em três réplicas técnicas em placas de 96 poços no equipamento *7500 FAST Real Time System*[18] e foi utilizado kit comercial Gotaq® qPCR Master Mix[19].

Para cada animal, foram construídas duas placas (uma para cada região – dorso/ventre) contendo todos os três genes alvos e os dois endógenos, em todos os momentos, além disso foi adicionado em cada placa um controle negativo (*no template*) para cada gene e um controle positivo (cDNA utilizado nas curvas padrão de eficiência) para avaliar a variação interplacas.

4.5 Análise estatística

Na análise da concentração de RNA total e qualidade (relações de absorbâncias 260/280 e 260/230) de todas as amostras foi utilizado teste T de *Stundent* para identificar diferença entres os grupos afetado e controle.

Para a escolha do gene normalizador, as médias dos valores dos CV´s dos valores de 2^{-cT}, de cada momento, para ambos os genes endógenos (β-

[18] Applied Biosystems™ - California 94404, USA.
[19] Gotaq® qPCR Master Mix - Promega Corporation, Madison, WI 53711 USA.

actina e GAPDH), foram comparados utilizando teste dos postos sinalizados de Wilcoxon.

Os dados referentes a radiação solar nos momentos M3 e M4, foram submetidos a análise de variância - ANOVA e teste a posteriori de Tukey.

Segundo Yuan e colaboradores (2006) para se avaliar as diferenças de expressão gênica, das três colagenases, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: entre os momentos estudados, em cada região dentro de cada grupo foi utilizado ANOVA de medidas repetidas e Tukey a posteriori; comparações entre regiões (dorso e ventre) dentro de cada grupo, ao longo do período experimental, foi utilizado ANOVA e teste de múltiplas comparações de Sidák; diferenças entre grupos, tanto amostras de dorso quanto de ventre, foram avaliadas com teste T de *Stundent* para amostras independentes.

Todas as análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 7.00[20] e as medidas de tendência central e dispersão apresentadas em tabelas e gráficos *boxplots*, as diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$ e demonstradas nos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 Tratamento dos grupos: restrição e exposição à radiação solar.

Foi possível manter os 12 animais em baias individuais sem qualquer incidência de radiação solar durante o período proposto, sem prejuízo a saúde dos animais, exceto um animal do grupo afetado e um do grupo controle, que tiveram discreto edema de membros na altura dos metatarsianos. Ambos os animais foram submetidos a passeios diários de 5 a 10 minutos no corredor central do grupo de baias de experimentação ou do lado de fora no período noturno, o que foi suficiente para normalização do retorno venoso e desaparecimento dos sinais de edema.

Com fechamento total das aberturas nas janelas e portas do prédio das baias de experimentação (Figuras 5-A e 5-B), foi possível reduzir a incidência de radiação solar a níveis não detectáveis pelo equipamento de aferição, conforme

[20] GraphPad Prism® 7.00 - GraphPad Software, Inc. San Diego, CA 92108, USA.

demonstrado na Figura 5-D, e manter o ambiente com uma temperatura e umidade consideradas como adequadas (Figura 5-C), pois, durante todo o período de restrição dos animais, as baias de experimentação eram limpas de duas a três vezes ao dia, a cama resposta diariamente e nenhum odor ou sensação de desconforto térmico foi considerado inadequado pelas pessoas que fizeram o manejo dos animais.

No segundo dia da fase de exposição (após M3) o animal n°05, do GA, sofreu um acidente no piquete, desta forma necessitou de cuidados veterinários e precisou ser retirado do experimento. Afim de manter a amostragem balanceada entre os grupos, optou-se por não analisar as amostras do animal nº05 até o momento em que participou do experimento, bem como o animal n°06 do GC, pois o mesmo era o controle do equino n°05 do GA.

Com o equipamento portátil de aferição da radiação, foi possível demonstrar a diferença significativa ($P<0,05$) na quantidade de radiação solar, a qual as regiões de dorso e ventre dos animais é exposta (Figura 6), sendo que região dorsal no GA recebeu oito vezes mais radiação que a região ventral ($P<0,05$) em M3 e 11 vezes mais ($P<0,01$) em M4. No GC também houve exposição oito vezes maior da região dorsal em M3 ($p<0,05$) e 10 vezes maior em M4 ($P<0,001$) (Figura 7).

Com a técnica de biópsia incisional de pele foi possível extrair fragmento com todas as camadas (epiderme até o extrato basal da derme) para que análise pudesse ser mais homogênea possível.

Durante a fase de restrição houveram deiscências de sutura das biópsias em dois animais, um do grupo controle, macho na região ventral em M0, outro do grupo afetado, fêmea, na região ventral em M1. Já na fase de exposição solar, onde os animais se encontravam em piquetes de terra, ocorreram deiscências em suturas das biopsias de M2 e M3 de quatro animais do GC, em dois destes ocorreram deiscências em suturas de biópsias do M4. Nenhuma das suturas apresentaram qualquer tipo de supuração.



Figura 5. Baias de experimentação durante a fase de restrição à luz solar. Em A e B um animal controle e um afetado, respectivamente, em C termômetro demonstrando temperatura dentro do conjunto de baias de experimentação, em D aferição da radiação solar.



Figura 6. Aferição da radiação solar na região de dorso (A) e ventre (B) de um equino afetado por HERDA, a direção da fotocélula do equipamento está indicada nas setas brancas. Notar, nas imagens de zoom do equipamento, a diferença de aproximadamente oito vezes entre a incidência de radiação solar na região dorsal e ventral de um equino adulto.

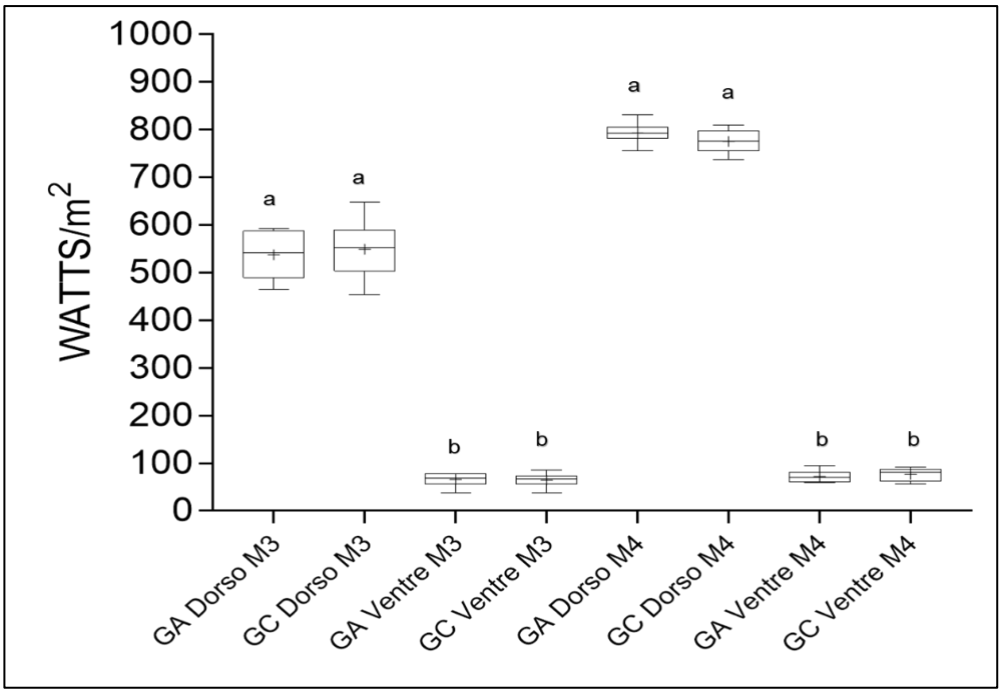


Figura 7. Boxplots demonstrando as diferenças entre exposição solar da região dorsal e ventral do GA e GC em M3 e M4. Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

5.2 Análise da expressão gênica pela técnica de qPCR

5.2.1 Concentração e qualidade do RNA total das amostras

Com a padronização da fragmentação e pesagem das amostras de pele foi possível obter amostras com concentrações de RNA total que não diferiram estatisticamente entre os grupos (P>0,05), além disto a qualidade do RNA total em ambos os grupos se manteve dentro do considerado como ideal (relação absorbância 1,8-2,2) e também não diferiram (P>0,05) entre os grupos (Figura 8).

Amostra utilizada nos testes dos conjuntos de *primers,* bem como na construção das curvas de eficiência foi submetida a análise de RIM (*RNA integrity number*) e foi considerada como íntegra, pois possuía score 8,2 (Figura 9). Segundo o fabricante do kit utilizado, é considerado com integridade adequada amostras com score >7,0.

Essa análise de integridade do RNA é imprescindível para minimizar os problemas na padronização das reações de transcriptase reversa e de qPCR, pois amostras com baixo grau de qualidade do RNA podem levar a subquantificação do RNAm.

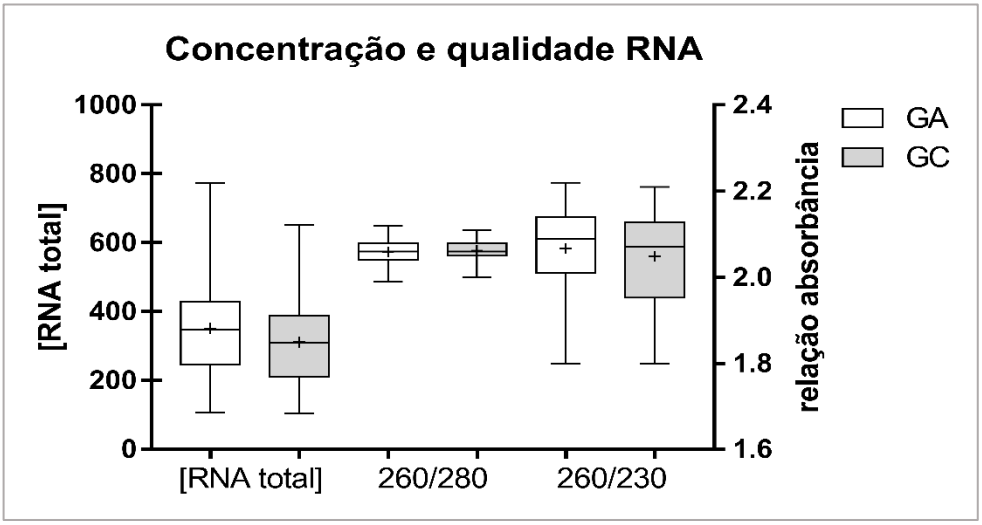


Figura 8. Boxplot demonstrando a variação da concentração de RNA total bem como a pureza pela análise da absorbância relativa das amostras de pele de equinos do grupo afetado (GA) e grupo controle (GC).

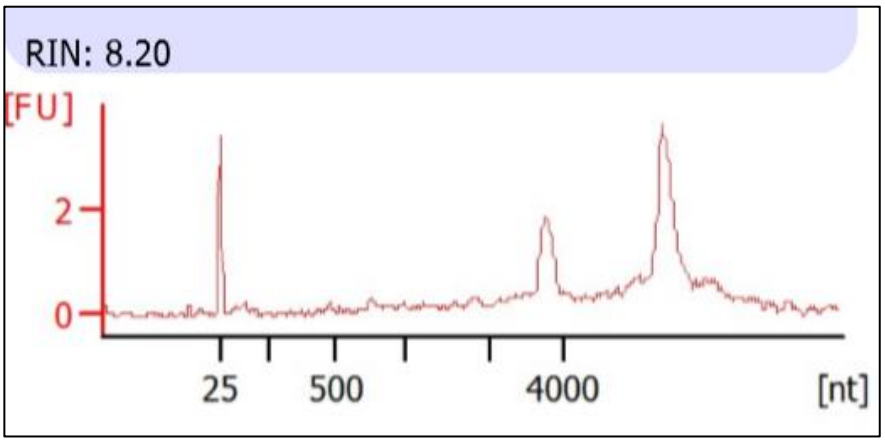


Figura 9. Eletroferograma demonstrando integridade do RNA da amostra padrão pelo *RNA Integrity Number* (RIM) realizado no equipamento de eletroforese capilar 2100 Bioanalyzer.

5.2.2 Curvas padrão e análise da eficiência da reação de qPCR e análise de variação do gene endógeno utilizado como normalizador

As eficiências das reações foram obtidas através da análise no equipamento *7500 FAST Real Time System* (Applied Biosystems^{TM}) conforme descrito na Tabela 3 e demonstrados nas Figuras 10 e 11, onde os valores de cT das triplicatas de cada diluição foram utilizadas no cálculo da eficiência. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E=10^{(-1/slope)}$, onde E corresponde à eficiência e "*slope*" corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada sequência de *primers* o programa criou um gráfico (*standart curve)* onde o valor do *slope* foi utilizado para determinar a eficiência dos *primers* para cada gene de interesse. O gráfico da eficiência foi construído com base no valor logaritmo das diluições seriadas (eixo X), e pelos valores da média de Ct (eixo Y). Já a curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência decresce com o aumento da temperatura e as pontes de hidrogênio que mantem as duplas fitas unidas se rompem, o SYBR-Green é liberado. A fluorescência só é emitida quando o DNA está em dupla fita, assim, quando observamos um único pico de fluorescência em determinada temperatura significa que o conjunto de *primers* amplificou um produto especifico.

Tabela 3. Valores de *Slope*, coeficiente de correlação (R^2) e eficiência de reação para cada um dos genes alvo e endógenos

Gene	*Slope*	R^2	Eficiência (%)
MMP1	-3,443	0,99	95,195
MMP8	-3,444	0,99	95,154
MMP13	-3,333	0,99	99,523
β-ACTINA	-3,434	0,99	95,511
GAPDH	-3,436	0,99	95,45

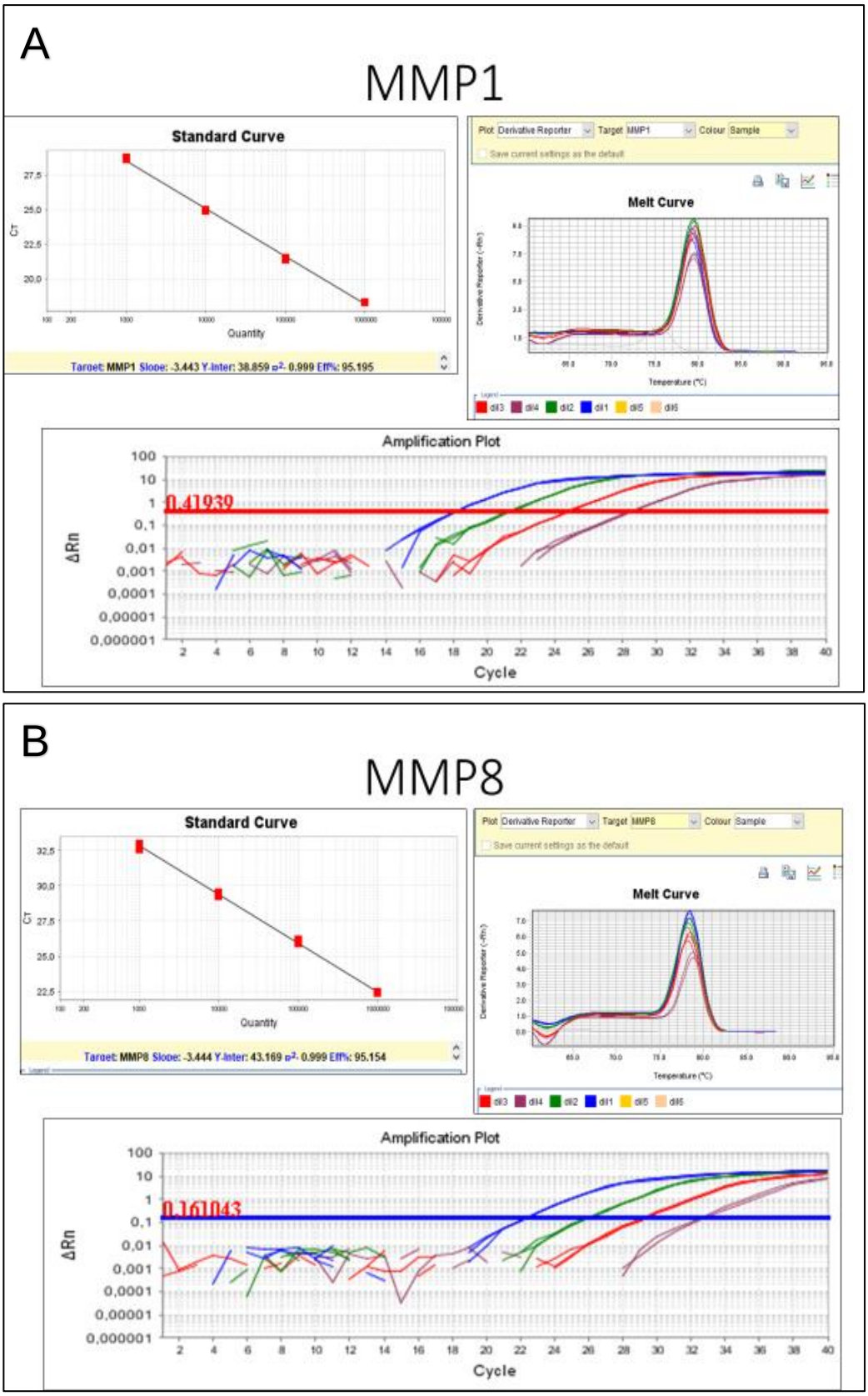


Figura 10. Gráficos demostrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de amplificação das diluições seriadas. Em A, B gráficos são referentes aos genes alvos MMP1 e MMP8, respectivamente.

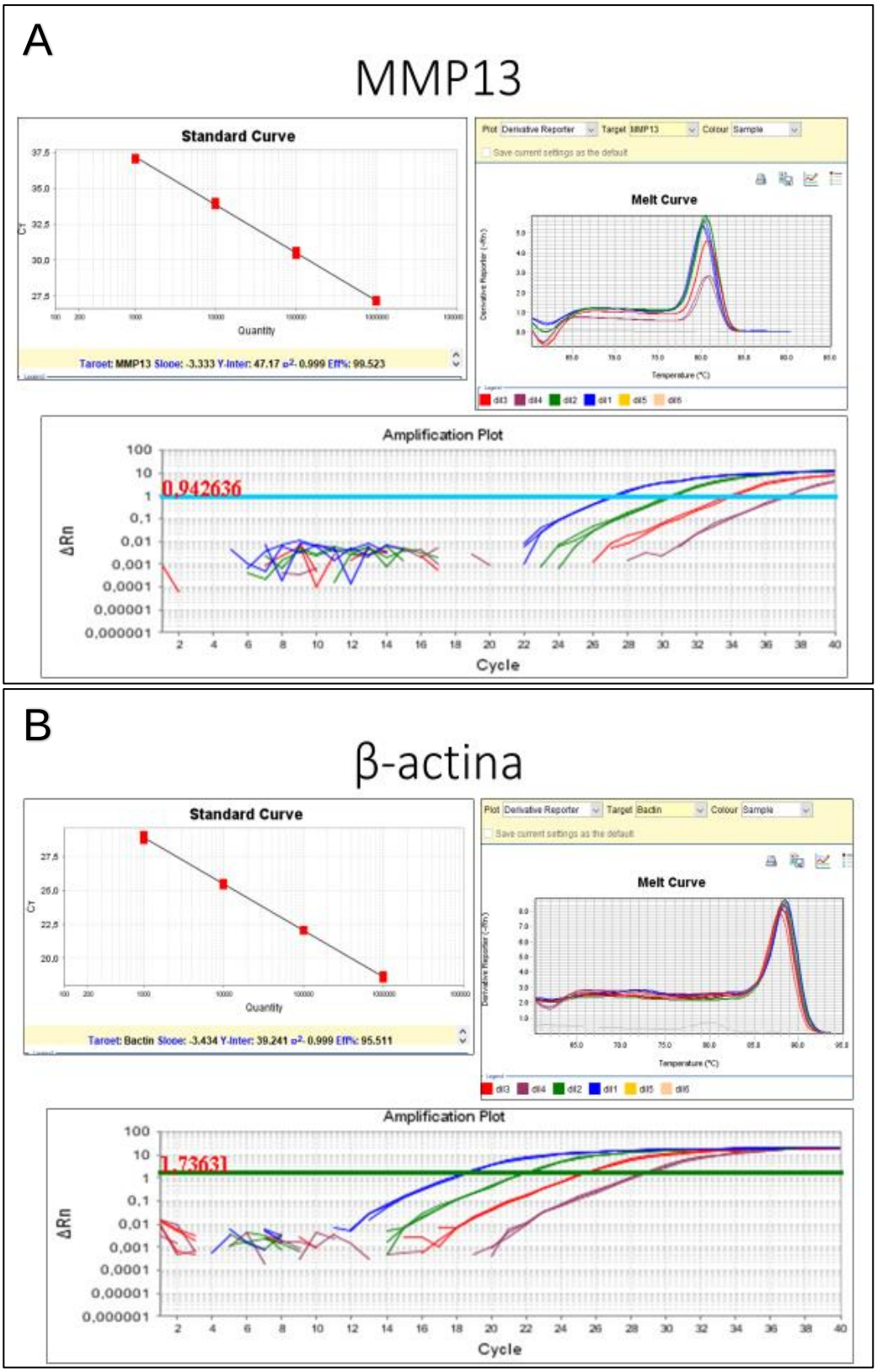


Figura 11. Gráficos demostrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de amplificação das diluições seriadas. Em A e B os gráficos são referentes aos genes alvo MMP13 e endógeno β-actina, respectivamente.

Não houve diferença estatística (P>0,05) na comparação entre os CV médios dos genes endógenos, conforme demonstrado na Figura 12, ambos apresentaram mesma variação ao longo do período experimental, dessa forma optou-se pelo gene da *β*-actina equina como normalizador endógeno.

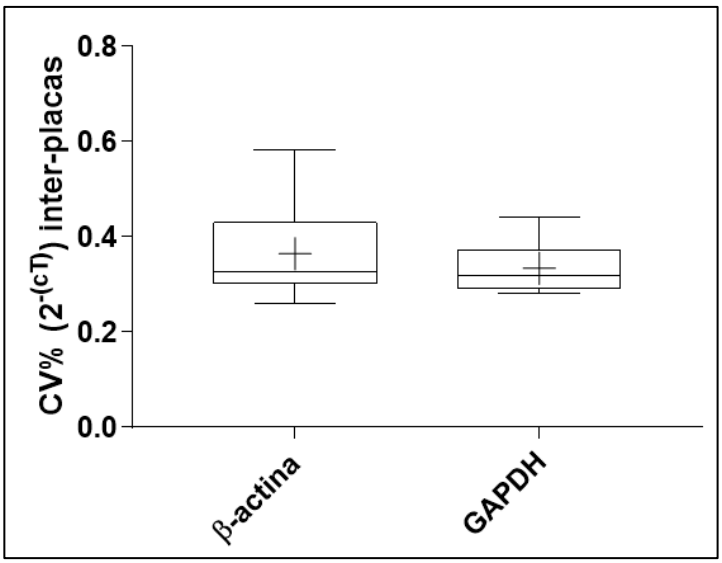


Figura 12. Boxplots demonstrando medidas de tendência central e dispersão dos coeficientes de variação dos Cts entre os momentos experimentais dos genes endógenos β-actina e GAPDH, sem diferença estatística (P>0,05).

5.3 Expressão gênica relativa das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 da pele de dorso e ventre de equinos afetados (HERDA) e normais

Os valores individuais e as medidas de tendência central e dispersão da expressão de cada colagenase, bem como as diferenças estatísticas da expressão calculada, em cada comparação, estão representadas em tabelas e gráficos Boxplots nas figuras inseridas imediatamente após as respectivas tabelas.

5.3.1 MMP1

Conforme os valores descritos na Tabela 4 e 6 e as diferenças estatísticas demonstradas na Figura 13-A e C, comparando os momentos experimentais tendo o M0 como normalizador, não houve diferença estatística (P>0.05) da expressão de MMP1 na pele de dorso de ambos os grupos até o primeiro dia de exposição à radiação solar (M3). No GA a expressão de dorso aumentou aproximadamente 50 vezes no 3º dia (M4) de exposição à radiação solar quando comparado ao 30° dia (M2) do período de restrição (P<0.05), diminuindo significativamente à níveis basais no 15º dia de restrição (Figura 13-A). No GC a expressão de MMP1 na pele do dorso foi 13 vezes maior no 3° dia (M4) de exposição ao sol quando comparado aos dois momentos do período de restrição (P>0,05), diminuindo a níveis basais em M5 (P<0,05) (Figura 13-C). Foi observado aumento significativo da expressão de MMP1 no ventre dos animais do GA em M5 em relação ao período de pré restrição e também da primeira semana de restrição (Tabela 5 e Figura 13-B). Nas amostras de ventre do GC não foram observadas diferenças estatísticas ao longo do período experimental conforme valores da Tabela 7 demonstrados na Figura 13-D.

Quando comparada a expressão de MMP1 das amostras de pele das regiões de dorso e do ventre de ambos os grupos (Tabelas 8 e 9), observou-se que no M4 a expressão de MMP1 na pele do dorso foi significativamente maior (P<0,05) que na pele ventral (Figura 14), sendo que no GA foi 20 vezes maior (Tabela 8), enquanto que no GC foi sete vezes mais expressa (Tabela 9). Quando comparadas as diferenças entre os grupos experimentais, notou-se que em M4 pele de dorso dos animais do GA sofreu maior influência da radiação solar que a pele dorsal dos animais do GC (Tabelas 10 e 11), pois a expressão de MMP1 foi quase duas vezes maior na pele de dorso do GA em relação ao GC (P<0,05), conforme demonstrado na Figura 15-A.

Deste modo observou-se que a radiação solar teve influência na expressão gênica de MMP1, com maiores níveis de expressão no 3º dia de exposição solar, após trinta dias de restrição, nas amostras de dorso de ambos os grupos experimentais e até o 15° dia de exposição nas amostras de ventre do GA. Também se evidenciou que a pele do dorso dos animais do GA expressa mais MMP1 quando expostos ao sol do que animais normais.

Tabela 4. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	3,67	1,02	28,42	149,23	3,48
	1,0	0,48	0,33	2,51	16,56	1,31
	1,0	2,12	0,1	15,21	63,4	1,89
	1,0	0,7	0,57	3,4	14,64	0,97
	1,0	8,79	9,01	1,29	29,48	4,52
Média	1,0[a]	3,152[a]	2,206[a]	10,17[a]	54,66[b]	2,434[a]
DP	0	3,40	3,81	11,64	56,36	1,51

[ab] *Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os momentos (P<0,05).*

Tabela 5. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,107	0,078	3,785	0,973	3,189
	1,0	0,673	2,428	19,534	1,187	4,785
	1,0	0,321	3,562	7,107	0,722	2,333
	1,0	0,45	1,541	0,319	1,381	1,497
	1,0	0,189	15,415	0,763	3,453	4,884
Média	1,0[a]	0,348[a]	4,605[ab]	6,302[ab]	1,543[ab]	3,338[b]
DP	0	0,22	6,17	7,88	1,09	1,49

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os momentos (P<0,05).

Tabela 6. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,11	0,055	0,526	7,175	2,713
	1,0	2,905	0,813	2,047	13,887	1,986
	1,0	2,305	3,509	1,47	43,491	4,119
	1,0	0,103	0,371	0,72	1,395	0,201
	1,0	12,721	14,699	35,577	82,661	9,618
Média	$1,0^{ab}$	$3,629^{a}$	$3,889^{a}$	$8,068^{ab}$	$29,72^{b}$	$3,727^{a}$
DP	0	5,238	6,19	15,39	33,74	3,58

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os momentos (P<0,05).

Tabela 7. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	3,334	5,031	5,751	7,51	23,111
	1,0	2,91	1,382	9,871	4,006	12,199
	1,0	1,024	7,715	5,629	8,4	33,804
	1,0	0,381	2,17	0,187	0,905	0,873
	1,0	3,461	54,544	30,062	5,422	3,238
Média	1,0	2,222	14,17	10,3	5,249	14,65
DP	0	1,42	22,71	11,57	2,979	13,82

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os momentos (P<0,05).

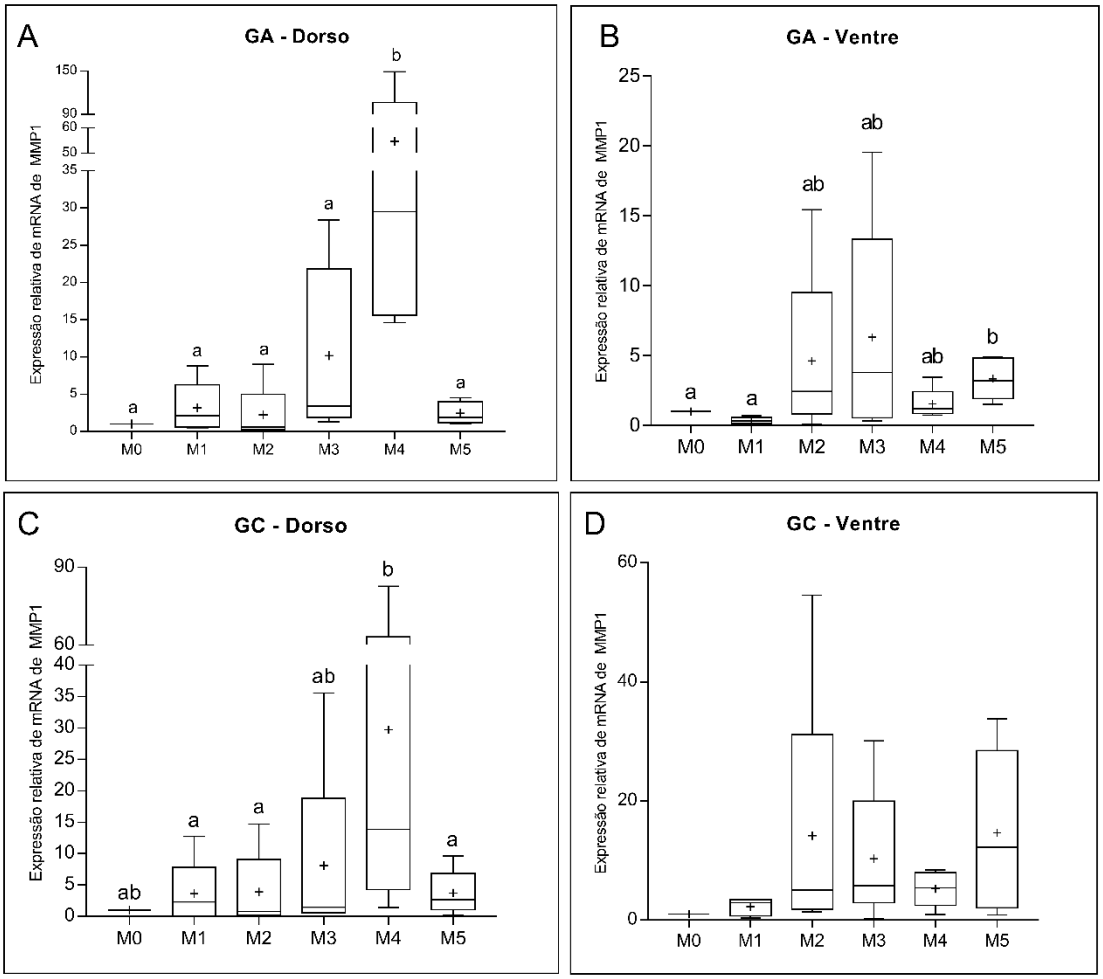


Figura 13. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatisticas (P<0,05).

Tabela 8. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Região	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	15,143	1,0	0,442	1,0	1,16	1,0	2,017	1,0	0,099	1,0	13,886
	1,0	0,175	1,0	0,245	1,0	1,308	1,0	1,366	1,0	0,013	1,0	0,639
	1,0	1,713	1,0	0,259	1,0	58,489	1,0	0,801	1,0	0,02	1,0	2,117
	1,0	1,763	1,0	1,13	1,0	4,778	1,0	0,165	1,0	0,166	1,0	2,707
	1,0	0,746	1,0	0,016	1,0	1,275	1,0	0,441	1,0	0,087	1,0	0,805
Média	1,0	3,908	1,0	0,418	1,0	13,4	1,0	0,958	1,0[a]	0,077[b]	1,0	4,031
DP	0	6,31	0	0,42	0	25,25	0	0,74	0	0,062	0	5,57

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre as regiões, em cada momento (P<0,05).

Tabela 9. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento **Região**	**M0** **Dorso**	**M0** **Ventre**	**M1** **Dorso**	**M1** **Ventre**	**M2** **Dorso**	**M2** **Ventre**	**M3** **Dorso**	**M3** **Ventre**	**M4** **Dorso**	**M4** **Ventre**	**M5** **Dorso**	**M5** **Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	0,057	1,0	1,724	1,0	5,152	1,0	0,619	1,0	0,059	1,0	0,483
	1,0	1,196	1,0	1,198	1,0	2,033	1,0	5,769	1,0	0,345	1,0	7,349
	1,0	0,484	1,0	0,215	1,0	1,064	1,0	1,853	1,0	0,093	1,0	3,971
	1,0	0,574	1,0	2,132	1,0	3,353	1,0	0,149	1,0	0,372	1,0	2,49
	1,0	1,097	1,0	0,299	1,0	4,07	1,0	0,927	1,0	0,072	1,0	0,369
Média	1,0	0,681	1,0	1,114	1,0	3,134	1,0	1,863	1,0[a]	0,1882[b]	1,0	2,932
DP	0	0,46	0	0,84	0	1,62	0	2,27	0	0,15	0	2,88

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre as regiões, em cada momento (P<0,05).

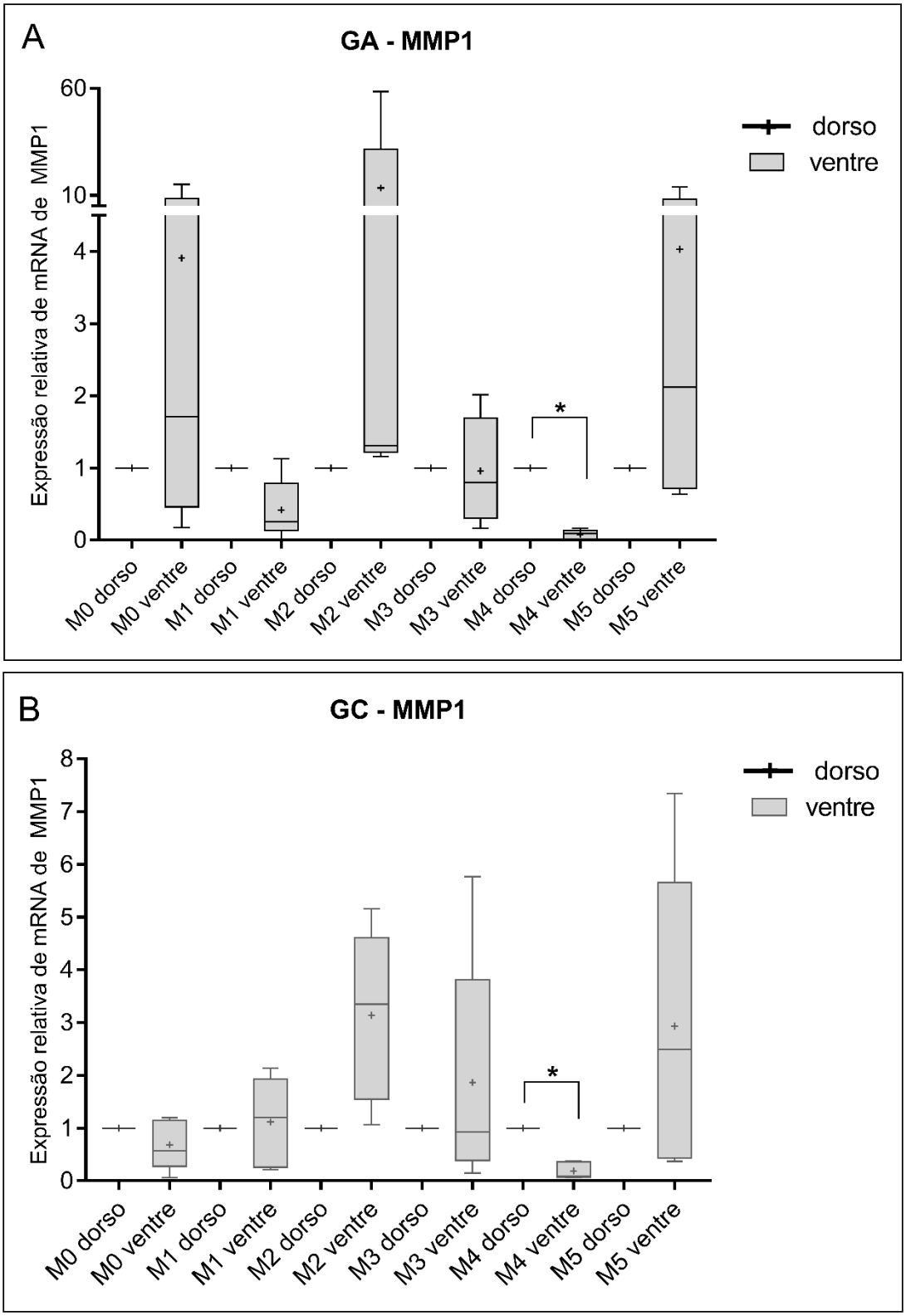


Figura 14. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre dorso e ventre ao longo do período experimental, sendo que em cada momento, as amostras de dorso foram consideradas controles e as de ventre calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre regiões no mesmo momento ($P<0,05$).

Tabela 10. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,097	1,0	3,233	1,0	1,784	1,0	5,209	1,0	2,007	1,0	0,124
	1,0	2,704	1,0	0,448	1,0	1,083	1,0	3,315	1,0	3,224	1,0	1,788
	1,0	0,871	1,0	0,802	1,0	0,026	1,0	9,009	1,0	1,269	1,0	0,399
	1,0	0,143	1,0	0,975	1,0	0,218	1,0	0,673	1,0	1,495	1,0	0,691
	1,0	5,039	1,0	3,483	1,0	3,089	1,0	0,183	1,0	1,797	1,0	2,369
Média	1,0	1,771	1,0	1,788	1,0	1,24	1,0	3,678	1,0[a]	1,958[b]	1,0	1,074
DP	0	2,11	0	1,44	0	1,25	0	3,61	0	0,76	0	0,96

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os grupos, em cada momento (P<0,05).

Tabela 11. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	25,785	1,0	0,83	1,0	0,402	1,0	16,971	1,0	3,339	1,0	3,558
	1,0	0,397	1,0	0,092	1,0	0,697	1,0	0,785	1,0	0,117	1,0	0,156
	1,0	3,084	1,0	0,967	1,0	1,424	1,0	3,893	1,0	0,265	1,0	0,213
	1,0	0,438	1,0	0,517	1,0	0,311	1,0	0,749	1,0	0,668	1,0	0,751
	1,0	3,425	1,0	0,187	1,0	0,968	1,0	0,087	1,0	2,181	1,0	5,166
Média	1,0	6,626	1,0	0,518	1,0	0,760	1,0	4,497	1,0	1,314	1,0	1,969
DP	0	10,8	0	0,38	0	0,45	0	7,12	0	1,39	0	2,26

Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, em nenhum dos momentos (P>0,05).

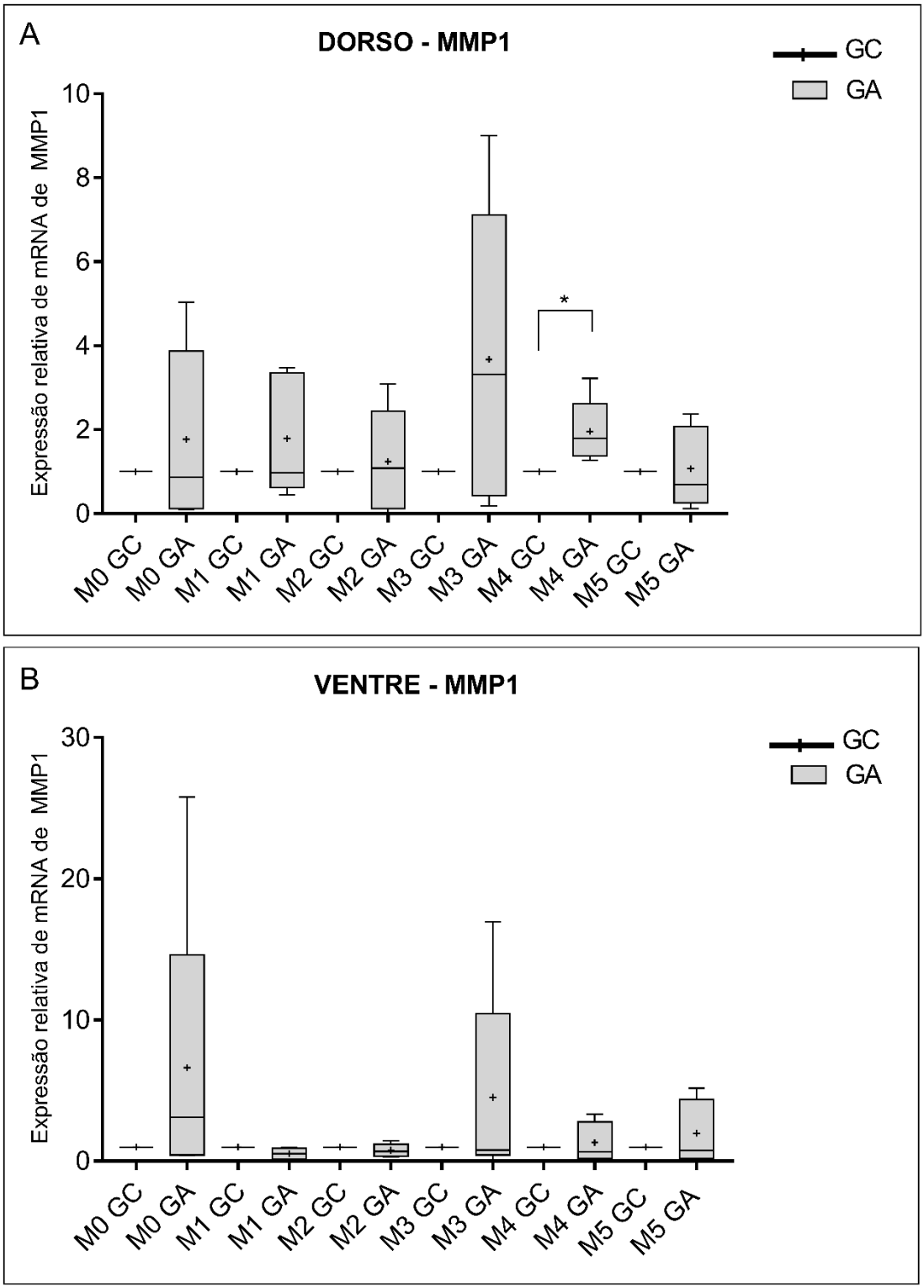


Figura 15. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) ($P<0,05$).

5.3.2 MMP8

Não foram observadas diferenças estatísticas nas expressões de MMP8 da pele de dorso em nenhum dos grupos estudados (P>0,05), bem como na pele do ventre do GC conforme demonstrado nos diagramas da Figura 16 (A,C e D, respectivamente) talvez devido a dispersão no valores individuais, que é possível observar nas tabelas 12, 14 e 15. Houve influência da radiação solar na expressão desta colagenase nas amostras de pele do ventre do GA, pois houve uma subexpressão nos primeiros 15 dias de restrição (M1) em relação ao M0 (P<0,05) e já no primeiro dia de exposição (M3) houve um aumento significativo de cinco vezes (tabela 13) na quantidade de transcritos de MMP8 (P<0,05) (Figura 16-B). Não foram observadas diferenças significativas nas expressões de MMP8 entre a pele de dorso e ventre dentro de cada grupo (Figura 17), bem como quando comparadas e expressão entre cada região de grupos diferentes (Figura 18), conforme análises descritas nas tabelas 16-17 e 18-19, respectivamente.

Tabela 12. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	1,078	1,044	6,444	7,875	0,416
	1,0	0,795	1,256	0,406	2,659	0,662
	1,0	0,209	0,06	0,179	0,489	0,44
	1,0	0,031	1,116	0,232	0,719	0,515
	1,0	1,802	1,195	3,974	18,388	3,31
Média	1,0	0,783	0,934	2,247	6,026	1,069
DP	0	0,71	0,49	2,84	7,52	1,25

Não houveram diferenças estatísticas entre os momentos (P>0,05).

Tabela 13. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,368	0,054	0,809	31,661	0,09
	1,0	0,28	0,628	2,196	2,602	0,608
	1,0	0,085	0,194	1,521	1,126	0,545
	1,0	0,206	0,969	3,145	0,427	2,04
	1,0	0,386	2,431	6,441	1,304	2,959
Média	$1,0^{ac}$	$0,265^{b}$	$0,855^{ab}$	$2,822^{c}$	$7,424^{abc}$	$1,248^{abc}$
DP	0	0,12	0,95	2,19	13,57	1,20

[ab] Letras sobrescritas nas médias representam diferenças estatísticas entre os momentos (P<0,05).

Tabela 14. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	2,531	0,806	1,084	0,154	0,076
	1,0	0,916	1,196	3,437	5,372	2,686
	1,0	1,412	0,315	7,031	3,431	2,427
	1,0	0,427	0,199	2,152	0,346	0,436
	1,0	10,998	2,546	3,448	10,926	1,257
Média	1,0	3,257	1,012	3,43	4,046	1,376
DP	0	4,39	0,94	2,24	4,42	1,16

Não houveram diferenças estatísticas entre os momentos (P>0,05).

Tabela 15. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	1,003	0,602	0,404	0,547	0,917
	1,0	1,167	1,316	5,314	15,57	0,584
	1,0	0,494	0,095	1,319	1,722	1,662
	1,0	0,706	2,082	6,292	0,635	1,009
	1,0	1,382	0,411	1,648	3,922	0,294
Média	1,0	0,950	0,901	2,995	4,479	0,893
DP	0	0,35	0,79	2,62	6,34	0,51

Não houveram diferenças estatísticas entre os momentos (P>0,05).

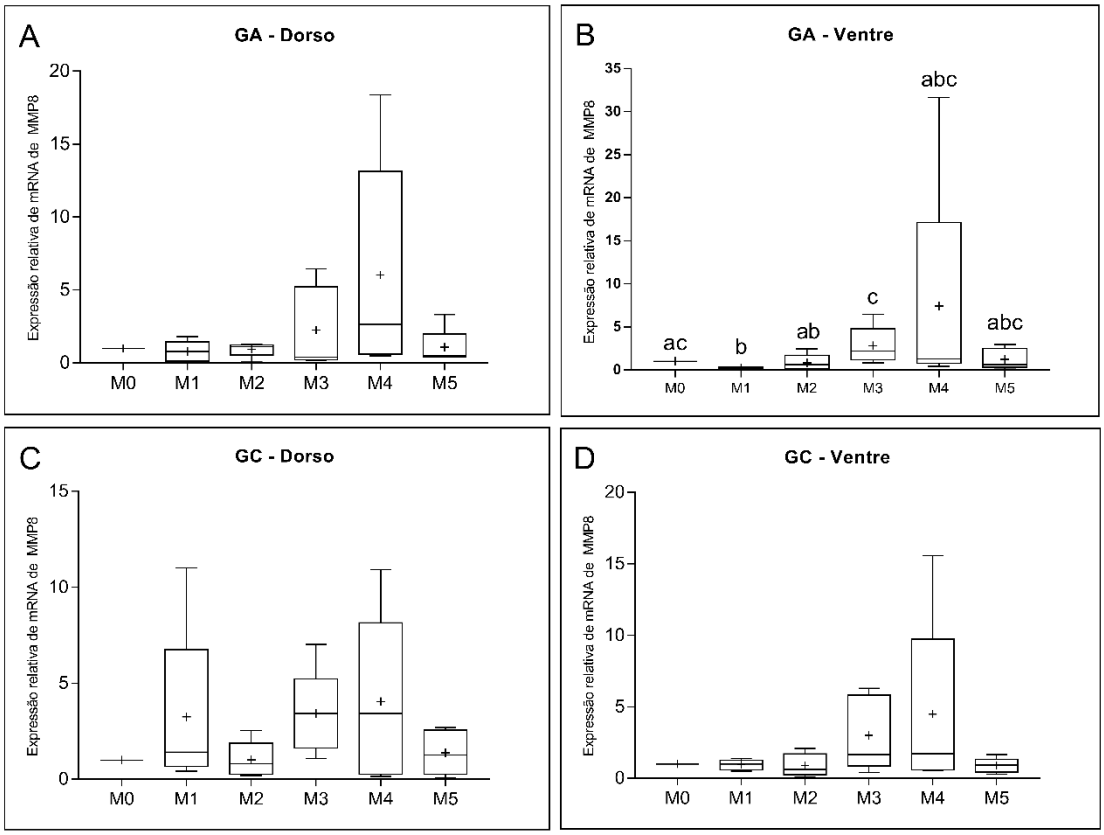


Figura 16. Boxplots demonstrando a variação na expressão gênica relativa de MMP8 na pele das regiões de dorso (A, C) e de ventre (B, D) de equinos dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatisticas (P<0,05).

Tabela 16. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento **Região**	**M0** **Dorso**	**M0** **Ventre**	**M1** **Dorso**	**M1** **Ventre**	**M2** **Dorso**	**M2** **Ventre**	**M3** **Dorso**	**M3** **Ventre**	**M4** **Dorso**	**M4** **Ventre**	**M5** **Dorso**	**M5** **Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	5,289	1,0	1,807	1,0	0,276	1,0	0,664	1,0	21,265	1,0	1,14
	1,0	1,62	1,0	0,571	1,0	0,811	1,0	8,768	1,0	1,585	1,0	1,489
	1,0	1,106	1,0	0,448	1,0	3,587	1,0	9,386	1,0	2,544	1,0	1,368
	1,0	0,843	1,0	5,657	1,0	0,732	1,0	11,427	1,0	0,5	1,0	3,337
	1,0	1,379	1,0	0,296	1,0	2,804	1,0	2,235	1,0	0,098	1,0	1,232
Média	1,0	2,047	1,0	1,756	1,0	1,642	1,0	6,496	1,0	5,198	1,0	1,713
DP	0	1,83	0	2,26	0	1,45	0	4,74	0	9,03	0	0,91

Não houveram diferenças estatísticas entre as regiões, em cada momento (P>0,05).

Tabela 17. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento **Região**	**M0** **Dorso**	**M0** **Ventre**	**M1** **Dorso**	**M1** **Ventre**	**M2** **Dorso**	**M2** **Ventre**	**M3** **Dorso**	**M3** **Ventre**	**M4** **Dorso**	**M4** **Ventre**	**M5** **Dorso**	**M5** **Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	0,825	1,0	0,327	1,0	0,616	1,0	0,307	1,0	2,926	1,0	9,929
	1,0	1,969	1,0	2,51	1,0	2,166	1,0	3,045	1,0	5,708	1,0	0,428
	1,0	1,761	1,0	0,616	1,0	0,531	1,0	0,33	1,0	0,884	1,0	1,206
	1,0	0,637	1,0	1,051	1,0	6,646	1,0	1,862	1,0	1,168	1,0	1,472
	1,0	3,688	1,0	0,463	1,0	0,595	1,0	1,763	1,0	1,324	1,0	0,863
Média	1,0	1,776	1,0	0,993	1,0	2,111	1,0	1,461	1,0	2,402	1,0	2,78
DP	0	1,21	0	0,89	0	2,62	0	1,15	0	2,01	0	4,01

Não houveram diferenças estatísticas entre as regiões, em cada momento (P>0,05).

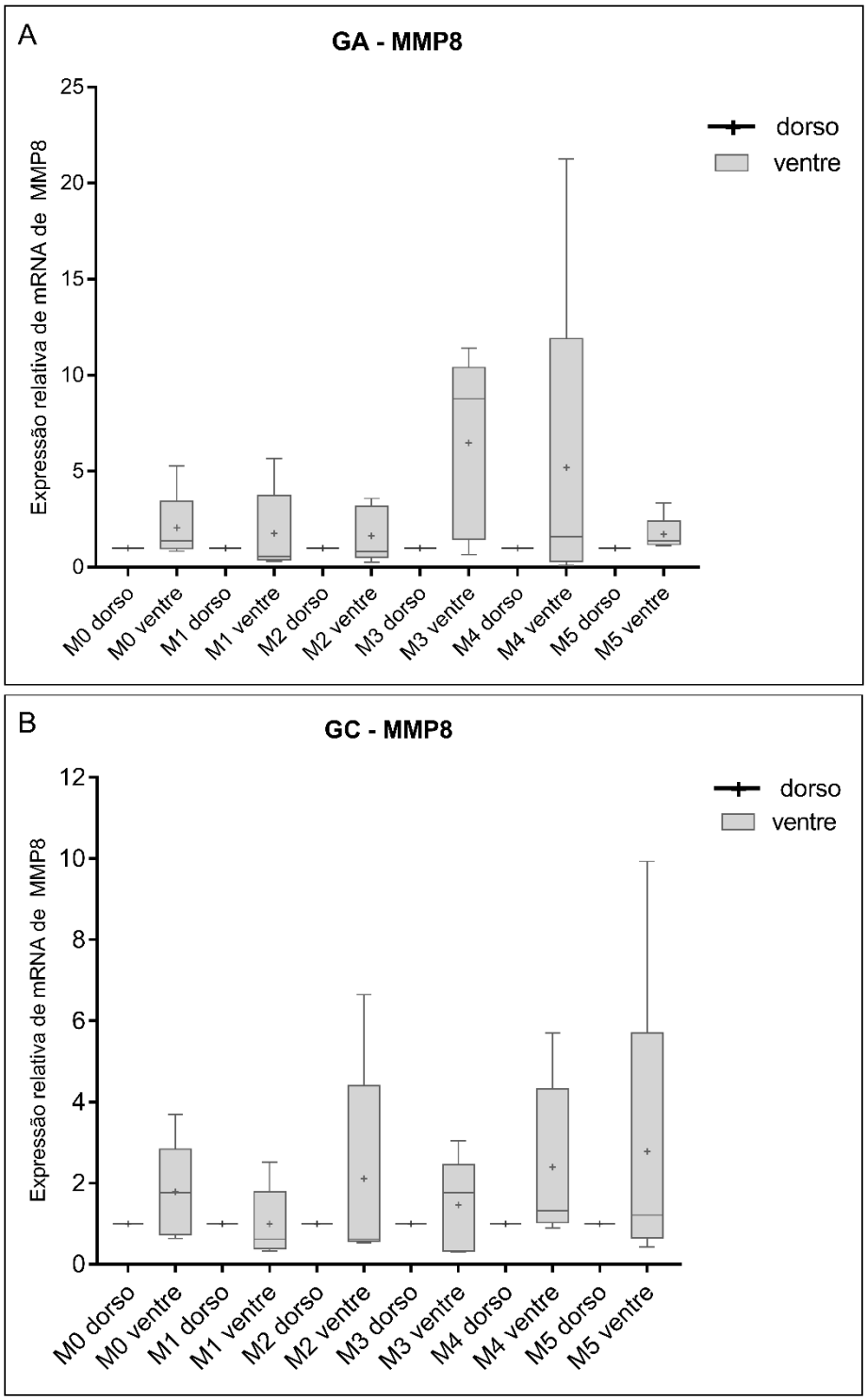


Figura 17. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 sem diferenças estatísticas entre dorso e ventre dos grupos de animais afetados (A) e controle normais (B).

Tabela 18. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	0,463	1,0	0,197	1,0	0,599	1,0	2,749	1,0	23,616	1,0	2,525
	1,0	2,298	1,0	1,996	1,0	2,412	1,0	0,271	1,0	1,137	1,0	0,566
	1,0	8,461	1,0	1,253	1,0	1,61	1,0	0,216	1,0	1,207	1,0	1,535
	1,0	1,251	1,0	0,09	1,0	7	1,0	0,135	1,0	2,6	1,0	1,477
	1,0	0,965	1,0	0,158	1,0	0,453	1,0	1,112	1,0	1,624	1,0	2,541
Média	1,0	2,688	1,0	0,738	1,0	2,415	1,0	0,896	1,0	6,037	1,0	1,729
DP	0	3,29	0	0,85	0	2,68	0	1,10	0	9,84	0	0,82

Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, em cada momento (P>0,05).

Tabela 19. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	2,967	1,0	1,09	1,0	0,269	1,0	5,937	1,0	171,631	1,0	0,29
	1,0	1,89	1,0	0,454	1,0	0,903	1,0	0,781	1,0	0,316	1,0	1,968
	1,0	5,312	1,0	0,911	1,0	10,868	1,0	6,127	1,0	3,472	1,0	1,741
	1,0	1,656	1,0	0,484	1,0	0,771	1,0	0,828	1,0	1,112	1,0	3,346
	1,0	0,361	1,0	0,101	1,0	2,134	1,0	1,41	1,0	0,12	1,0	3,628
Média	1,0	2,437	1,0	0,608	1,0	2,989	1,0	3,017	1,0	35,33	1,0	2,195
DP	0	1,85	0	0,39	0	4,45	0	2,76	0	76,21	0	1,34

Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, em cada momento (P>0,05).

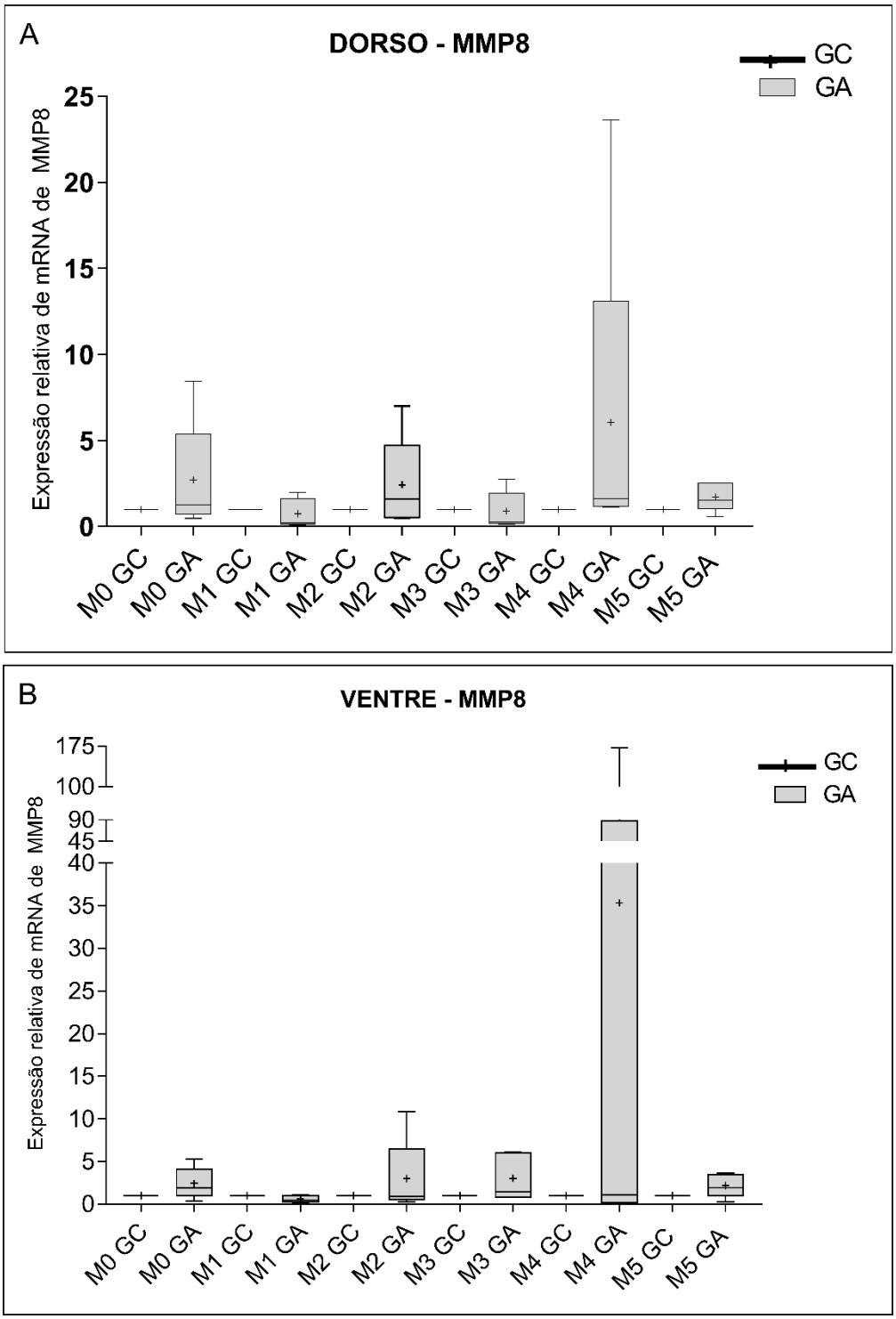


Figura 18. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Não houveram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) (P>0,05).

5.3.3 MMP13

Conforme dados descritos nas tabelas 20 a 23, não houve a influência da radiação solar na expressão gênica de MMP13 na pele dos animais estudados, pois não foi observado diferença estatística (P>0,05) nas amostras de dorso e ventre de ambos os grupos, ao longo do período experimental (Figura *19* 19).

Nas tabelas 24 e 25 estão os dados de expressão das amostras de dorso e ventre de ambos os grupos. Não houveram diferenças significativas (P>0,05) na expressão gênica da MMP13 entre regiões em nenhum dos grupos estudados (Figura 20).

Conforme dados descritos nas tabelas 26 e 27 e demonstrado na Figura 21, não foi observado diferença estatística (P>0,05) na expressão de MMP13 nas amostras de pele de dorso entre GA e GC, em nenhum dos momentos experimentais.

Tabela 20. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	3,187	1,282	0,851	1,878	0,742
	1,0	1,266	1,61	0,992	1,12	1,059
	1,0	7,408	1,331	1,898	4,107	14,715
	1,0	1,495	1,901	0,926	0,549	4,11
	1,0	2,842	1,042	0,962	2,187	2,211
Média	1,0	3,24	1,433	1,126	1,968	4,567
DP	0	2,47	0,33	0,43	1,35	5,82

Não houveram diferenças estatísticas da expressão média entre os momentos (P>0,05).

Tabela 21. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,214	0,172	0,04	0,032	5,339
	1,0	0,316	1,111	6,232	0,544	1,987
	1,0	0,421	8,555	0,06	0,018	0,247
	1,0	0,198	5,477	0,252	0,175	0,169
	1,0	1,09	2,512	0,618	1,12	26,285
Média	1,0	0,447	3,565	1,44	0,377	6,805
DP	0	0,37	3,45	2,68	0,46	11,09

Não houveram diferenças estatísticas da expressão média entre os momentos (P>0,05).

Tabela 22. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	1,637	2,332	0,908	1,116	11,828
	1,0	0,483	0,135	0,065	0,156	0,286
	1,0	18,217	2,919	2,901	9,413	2,945
	1,0	0,655	0,022	0,081	0,044	0,092
	1,0	0,748	1,107	2,251	1,734	1,349
Média	1,0	4,348	1,303	1,241	2,493	3,3
DP	0	7,76	1,29	1,28	3,93	4,9

Não houveram diferenças estatísticas da expressão média entre os momentos (P>0,05).

Tabela 23. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.

Momentos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ (valores individuais)	1,0	0,522	0,574	0,363	0,219	5,466
	1,0	0,756	0,603	0,249	0,9	0,22
	1,0	11,791	7,645	16,092	12,762	10,538
	1,0	1,785	0,014	0,158	0,21	1,002
	1,0	0,454	0,782	1,342	2,215	5,434
Média	1,0	3,062	1,924	3,641	3,261	4,532
DP	0	4,99	3,21	6,97	5,37	4,14

Não houveram diferenças estatísticas da expressão média entre os momentos (P>0,05).

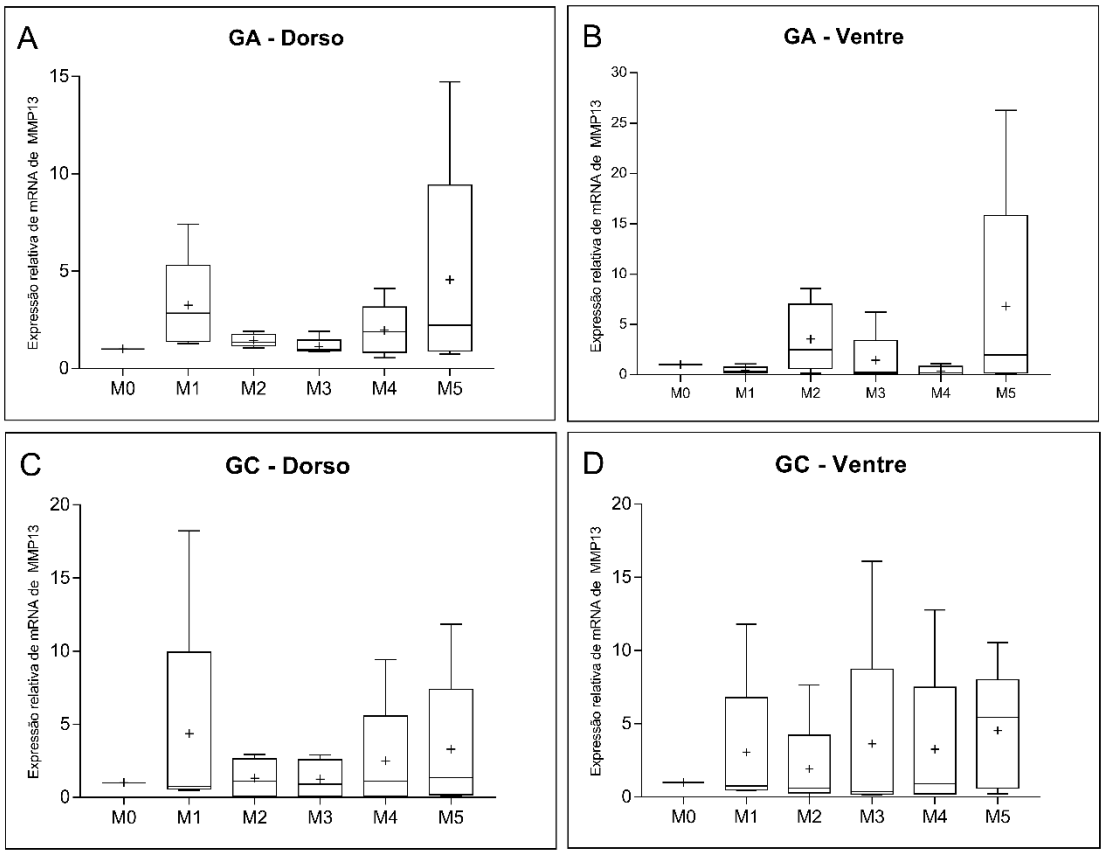


Figura 19. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Não houveram diferenças significativas entre os momentos avaliados (P>0,05) em nenhuma das regiões de ambos os grupos.

Tabela 24. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento **Região**	**M0** **Dorso**	**M0** **Ventre**	**M1** **Dorso**	**M1** **Ventre**	**M2** **Dorso**	**M2** **Ventre**	**M3** **Dorso**	**M3** **Ventre**	**M4** **Dorso**	**M4** **Ventre**	**M5** **Dorso**	**M5** **Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	21,562	1,0	1,449	1,0	2,886	1,0	1,009	1,0	0,372	1,0	155,072
	1,0	0,261	1,0	0,065	1,0	0,18	1,0	1,642	1,0	0,127	1,0	0,49
	1,0	8,711	1,0	0,495	1,0	55,978	1,0	0,275	1,0	0,038	1,0	0,146
	1,0	2,925	1,0	0,387	1,0	8,425	1,0	0,797	1,0	0,934	1,0	0,12
	1,0	0,341	1,0	0,131	1,0	0,823	1,0	0,219	1,0	0,175	1,0	4,058
Média	1,0	6,76	1,0	0,505	1,0	13,66	1,0	0,788	1,0	0,329	1,0	31,98
DP	0	8,95	0	0,55	0	23,88	0	0,58	0	0,35	0	68,83

Não houveram diferenças estatísticas na expressão média entre as regiões, em cada momento (P>0,05).

Tabela 25. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Região	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**	**Dorso**	**Ventre**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	2,011	1,0	0,641	1,0	0,495	1,0	0,804	1,0	0,395	1,0	0,929
	1,0	0,437	1,0	0,684	1,0	1,957	1,0	1,68	1,0	2,522	1,0	0,337
	1,0	0,3	1,0	0,194	1,0	0,787	1,0	1,667	1,0	0,407	1,0	1,075
	1,0	0,589	1,0	1,605	1,0	0,361	1,0	1,15	1,0	2,799	1,0	6,397
	1,0	1,904	1,0	1,154	1,0	1,345	1,0	1,135	1,0	2,432	1,0	7,667
Média	1,0	1,048	1,0	0,855	1,0	0,989	1,0	1,287	1,0	1,711	1,0	3,281
DP	0	0,83	0	0,53	0	0,66	0	0,37	0	1,20	0	3,46

Não houveram diferenças estatísticas na expressão média entre as regiões, em cada momento (P>0,05).

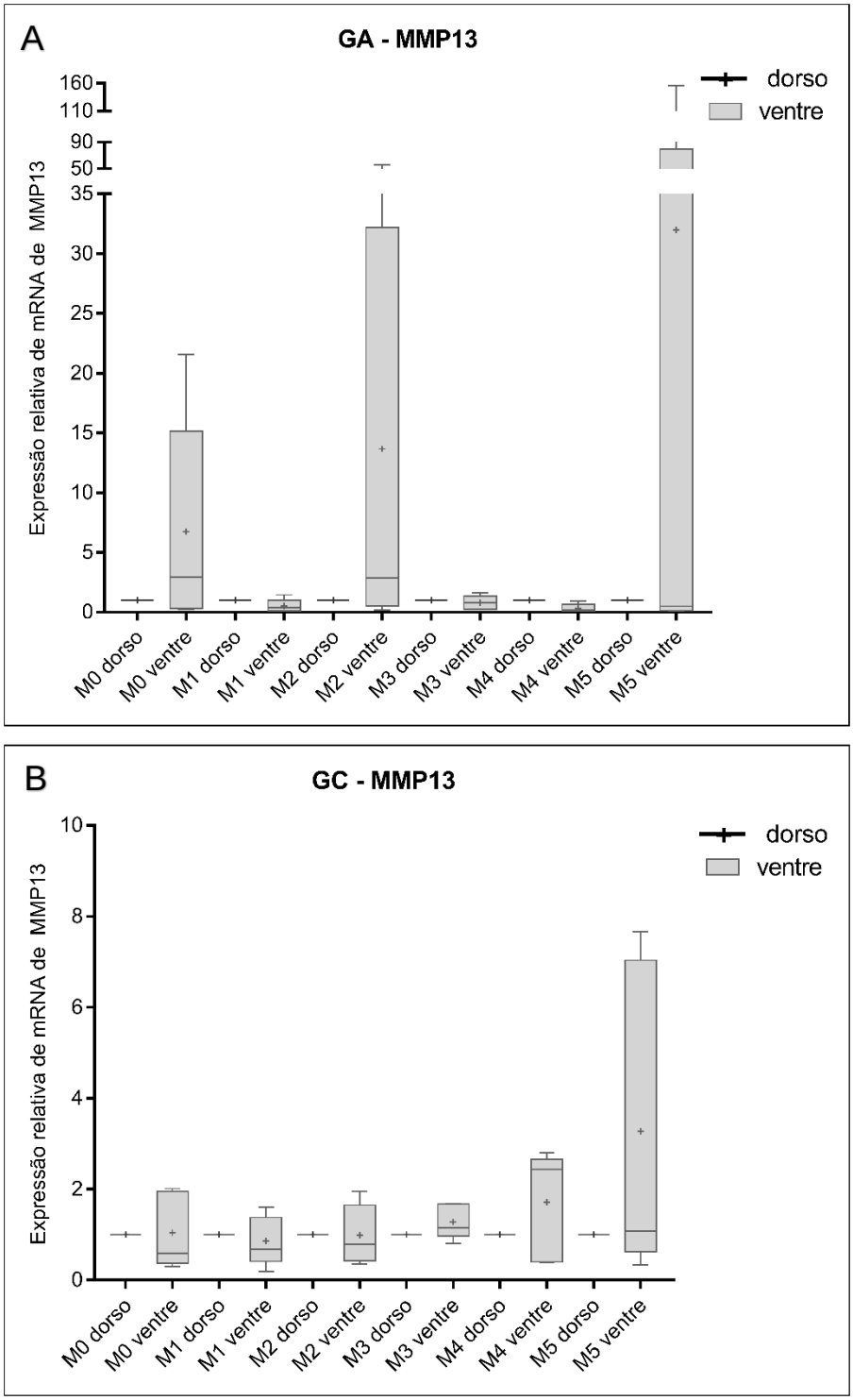


Figura 20. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso e ventre do GA (A) e GC (B). não houveram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos estudados (P>0,05).

Tabela 26. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	0,895	1,0	1,742	1,0	0,492	1,0	0,838	1,0	1,505	1,0	0,056
	1,0	0,451	1,0	1,183	1,0	5,4	1,0	6,903	1,0	3,24	1,0	1,673
	1,0	0,605	1,0	0,246	1,0	0,276	1,0	0,396	1,0	0,264	1,0	3,024
	1,0	0,143	1,0	0,327	1,0	12,122	1,0	1,646	1,0	1,779	1,0	6,385
	1,0	1,507	1,0	5,727	1,0	1,419	1,0	0,644	1,0	1,902	1,0	2,47
Média	1,0	0,720	1,0	1,845	1,0	3,942	1,0	2,085	1,0	1,738	1,0	2,722
DP	0	0,51	0	2,25	0	5,01	0	2,73	0	1,06	0	2,33

Não houveram diferenças estatísticas na expressão média entre os grupos, em cada momento (P>0,05).

Tabela 27. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias ± desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta cT)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001).A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.

Momento	**M0**	**M0**	**M1**	**M1**	**M2**	**M2**	**M3**	**M3**	**M4**	**M4**	**M5**	**M5**
Grupo	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**	**GC**	**GA**
$2^{-(\Delta\Delta cT)}$ *(valores individuais)*	1,0	9,591	1,0	3,94	1,0	2,868	1,0	1,053	1,0	1,416	1,0	9,369
	1,0	0,27	1,0	0,113	1,0	0,498	1,0	6,746	1,0	0,163	1,0	2,433
	1,0	17,544	1,0	0,626	1,0	19,631	1,0	0,065	1,0	0,025	1,0	0,411
	1,0	0,712	1,0	0,079	1,0	283,005	1,0	1,14	1,0	0,593	1,0	0,12
	1,0	0,27	1,0	0,649	1,0	0,868	1,0	0,124	1,0	0,137	1,0	1,308
Média	1,0	5,677	1,0	1,081	1,0	61,37	1,0	1,826	1,0	0,466	1,0	2,728
DP	0	7,73	0	1,62	0	124,1	0	2,79	0	0,57	0	3,82

Não houveram diferenças estatísticas na expressão média entre os grupos, em cada momento (P>0,05).

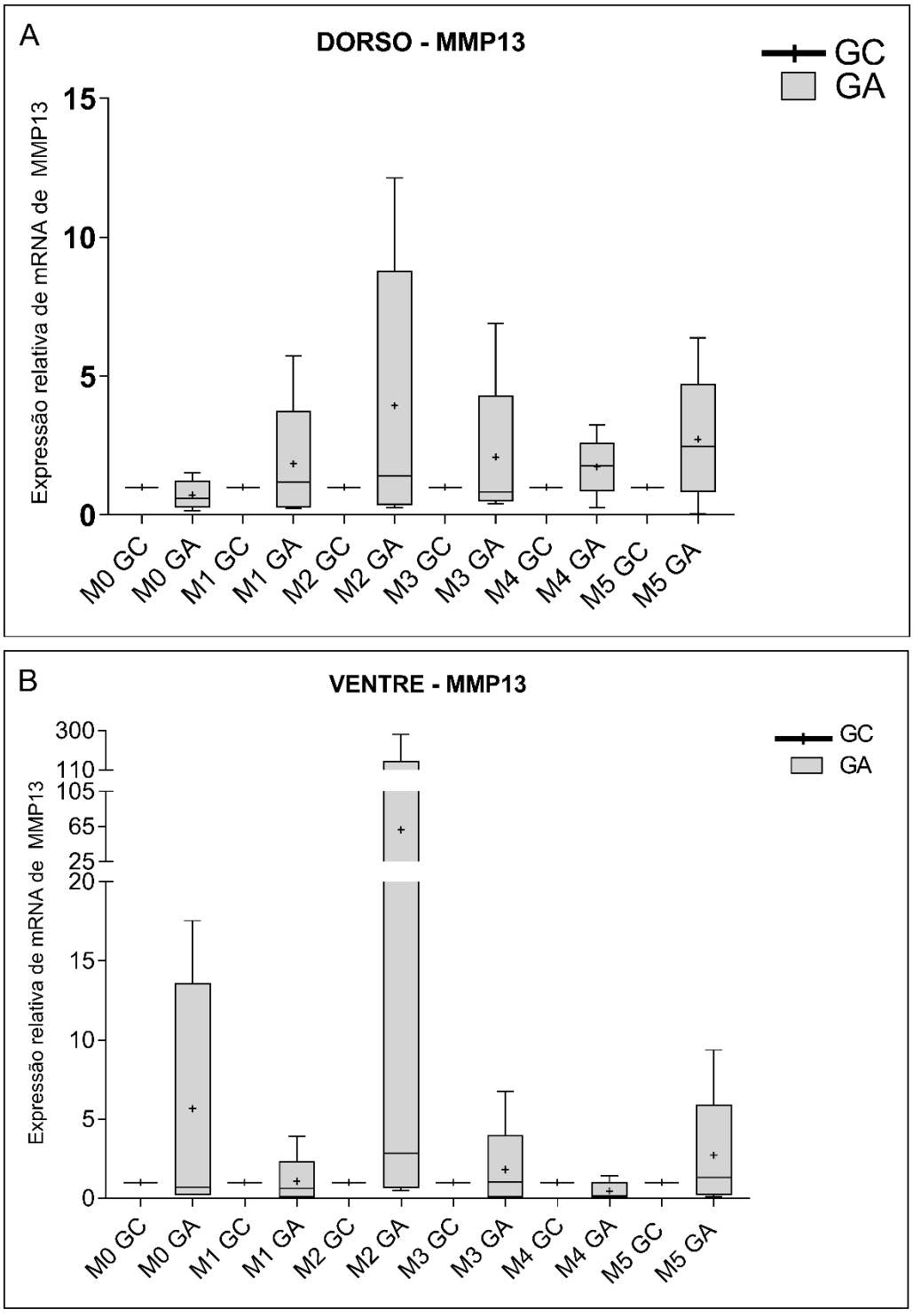


Figura 21. Boxplots demonstrando a comparação da expressão gênica da MMP13 na pele de dorso e ventre (A e B, respectivamente) entre os grupos GA e GC ao longo do período experimental. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos em nenhuma das regiões avaliadas (P>0,05). Em B, o valor de P acima dos diagramas do M4, indica tendência a diferença estatística entre grupos (P=0,057).

6. DISCUSSÃO

A qPCR é uma excelente ferramenta para se analisar diferenças de expressão genica, pois é altamente sensível e específica (BUSTIN et al., 2005), todavia necessita de uma série de cuidados para a normalização dos resultados afim de se evitar erros de interpretação, como por exemplo a escolha do gene normalizador, ou gene endógeno. Preferencialmente o gene ou genes endógenos escolhidos para normalização devem ser aqueles que que foram expressos constitutivamente sem sofrer influência do tratamento experimental realizado (KUBISTA et al., 2006; SMITS et al., 2009). Corroborando com estes pesquisadores, neste estudo observamos que ambos os genes endógenos permaneceram estáveis durante os tratamentos, pois não houve diferença estatística ($P<0,05$) entre o coeficiente de variação dos genes endógenos B-actina e GAPDH equina ao longo do período experimental, o mesmo foi observado por pesquisadores que investigaram a estabilidade de genes candidatos a serem utilizados como genes normalizadores em pesquisas de expressão genica em blastocistos de equinos (SMITS et al., 2009), todavia, outros observaram melhor estabilidade do gene B-actina em linfócitos de cavalos submetidos a estresse de enduro (CAPPELLI et al., 2008).

Não foi encontrado, na literatura consultada, trabalhos que tenham demostrado a influência da radiação solar na estabilidade de genes endógenos (B-actina ou GAPDH) na pele de equinos, embora não seja o objetivo deste trabalho fazer tal análise, optou-se por utilizar a B-actina como gene normalizador, pois corroborando com as observações aqui realizadas, já foi demostrado que a B-actina é um gene estável, tanto na pele de equinos normais quanto animais com doença de pele (BOGAERT et al., 2006).

A radiação solar interferiu diretamente na expressão gênica de Metaloproteinases de Matriz na pele de equinos do grupo afetado e também grupo controle, pois houve aumento da expressão de MMP1 e também da MMP8 ($P<0,05$) na fase de exposição ao sol, após um período de 30 dias protegidos da radiação solar, sendo que os picos de expressão foram, respectivamente, em M4 e M3. O mesmo não foi observado na expressão de MMP13, todavia, houve uma tendência a subexpressão na pele do ventre do GA em relação ao GC, pois

o GA expressou quatro vezes menos MMP13 no M4 em relação a pele ventral do GC, todavia sem diferença significativa (P>0,05).

Neste estudo, utilizamos amostras que continham tecido de epiderme e derme de equinos, foi observado influência da radiação solar na regulação da expressão de MMP1, corroborando com os achados de Fisher et al. (1996), Lahmann et al. (2001) e Brennan et al. (2003), pois da mesma forma que a radiação solar simulada interfere na expressão de MMP´s na pele de humanos, a radiação solar natural interfere na expressão de MMP´s na pele de equinos *in vivo*, o que sugere um padrão de degradoma cutâneo semelhante entres estas espécies e que o processo de degradação da matriz extracelular dérmica pode ocorrer em equinos em um processo semelhante ao fotoenvelhecimento cutâneo em humanos, ocasionado pela radiação solar (LAHMANN et al., 2001).

Em outro estudo, pesquisadores observando a atividade enzimática de MMP1 e MMP8 na pele de humanos irradiada com UV, verificaram maior quantidade relativa de mRNA e proforma proteica de MMP1 em amostras irradiadas com 2 MED de UV até 24 horas pós tratamento, além disto, apesar de não detectarem expressão gênica de MMP8, observaram, em testes de imunofluorêscencia, um aumento na expressão proteica de uma proforma da enzima em tecido com infiltração neutrofílica de quatro a oito horas pós radiação UV na derme e até 24 horas pós radiação em epiderme (FISHER et al., 2001). Neste trabalho observamos um comportamento da MMP8 que corrobora com tais achado de Fisher e colaboradores (2001), pois a expressão gênica da MMP8 na pele ventral dos equinos do GA também variou ao longo do periodo de exposição a radiação solar, o que é interessante, uma vez que esta enzima fica contida em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, e esta célula normalmente está presente, predominantemente, em tecidos inflamados (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2007; SCHUBERT-UNKMEIR et al., 2010).

Brennan e colaboradores (2003) não obsevaram diferença na expressão de MMP13 entre amostras de pele expostas a radiação e amostras controle não expostas, o mesmo ocorreu neste estudo, pois não houveram diferenças significativas (P>0,05) na expressão de MMP13 na pele da região dorsal e ventral dos equinos de ambos os grupos, em nenhum dos momentos estudados. Todavia, foi observado uma tendência a subexpressão desta MMP na pele do ventre do GA em comparação ao GC no M4. Seguindo a comparação entre

grupos, a MMP1 também diferiu entre GA e GC no M4, sendo mais expressa na pele de dorso do GA em relação ao GC. Embora pesquisadores já tenham evidenciado um padrão de expressão oposto entre MMP1 e MMP13 (URÍA et al., 1998) não podemos afirmar que esse padrão existiu neste trabalho, pois a analise não alcançou o nivel de significancia de $P<0,05$. Além disto, na análise seriada, ou seja ao longo do tempo, não observou-se diminuição significativa na expressão de MMP13 no mesmo grupo de amostras em que foi observado aumento da MMP1.

O fato de que a expressão de MMP1 na pele dorsal do GA ter sido maior que no GC ($P<0,05$) no M4 pode ter ocorrido devido a conformação ultraestrutural desorganizada, que torna a pele dos afetados mais fina e menos densa (RASHMIR-RAVEN et al., 2015), e consequentemente, com uma maior área de exposição de fibloblastos dérmicos à radiação solar, influenciando na expressão gênica de colagenases, além de maior área de contato molecular para atuação enzimática.

São necessários mais trabalhos, principalmente de expressão proteica e de zimologia, para identificar, tanto o(s) extrato(s) celular(es) que pode(m) sofrer uma mudança em seu metabolismo devido a influência da radiação solar, quanto a atividade enzimática envolvida no processo de degradoma cutâneo em equinos com HERDA, pois sabe-se que nem todo RNAm é traduzido em proteína (LEPHART, 2017).

Segundo a literatura consultada, equinos afetados por HERDA devem ser mantidos protegidos do sol para que ocorra melhora clínica e diminuição da severidade das feridas cutâneas (RASHMIR-RAVEN, 2013), pois acredita-se que a incidência de radiação solar pode contribuir para piora do quadro clinico devido as lesões serem mais comuns na região dorsal, onde a incidência de radiação e o calor são mais intensos, (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; RASHMIR-RAVEN et al., 2004; WHITE et al., 2004). Concordando com esses autores, ficou evidenciado aqui, que a radiação solar na região dorsal é significativamente maior ($P<0,001$) que a região ventral, todavia a expressão gênica das colagenases, aqui estudadas, durante o período de restrição mantiveram-se em níveis basais, semelhantes ao M0, onde os animais estavam em condições à campo, expostos ao sol, e mesmo tendo aumentando de maneira significativa no período de exposição imediato, voltou a níveis basais

aos 15 dias de exposição. Desta forma, um manejo onde os animais afetados ficariam sendo protegidos por um tempo e novamente expostos posteriormente, pode gerar uma condição de reativação constante da expressão de enzimas que atuam no degradoma cutâneo.

Desta forma, fica evidente que a região dorsal dos equinos recebe mais radiação solar que a ventral e, apesar de parecer algo óbvio, não se tinham dados que comprovassem cientificamente essa afirmação. Outra questão é que animais que passam um longo período protegidos do sol, quando expostos novamente, tem um estimulo ao aumento na expressão de colagenase cutânea, e como ficou evidenciado neste trabalho que animais afetados tem essa expressão aumentada em relação à animais normais, também foi possível comprovar a maior susceptibilidade ao estimulo físico causado pela radiação solar à expressão de colagenase intersticial dos animais afetados, conforme sugerido por Rashmir-Raven e colaboradores (2015) que comprovaram a susceptibilidade da pele dos animais afetados à ação de colagenase exógena, em seus estudos. Ademais, os animais afetados devem ser então protegidos da radiação solar, pelo menos nos períodos do dia de maior incidência de temperatura e radiação solar.

7. CONCLUSÃO

A radiação solar influencia na expressão gênica da MMP1, na pele de equinos com HERDA e animais normais, com pico de expressão às 72 horas de exposição ao sol na pele do dorso, e no ventre aos 15 dias de exposição à radiação solar natural, após um periodo de 30 dias de restrição total de luz solar.

A pele da região dorsal dos animais com HERDA é mais suscetível a ação da radiação solar, na expressão de colagenase cutânea, do que animais normais, sendo indicado um manejo que permita a proteção desses animais aos periodos de mair incidencia de radiação solar.

8 REFERÊNCIAS

ABQM - Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de milha. A indústria do QM no Brasil – dados fornecidos até jan/2017. Disponível em: <http://www.abqm.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=3336&Itemid=123>. Acesso em 25 de janeiro de 2020.

BÄCHINGER, H. P. The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 35, p. 17144–8, 15 dez. 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316229>.

BADIAL, P. R.; CISNEROS-ÀLVAREZ, L. E.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; TOMAZ, M. A. R. V; MACHADO, V. M.; BORGES, A. S. Ocular dimensions, corneal thickness, and corneal curvature in quarter horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 5, p. 385–392, 2015.

BADIAL, P. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; PANTOJA, J. C. F.; MOREIRA, J. C. L.; CONCEIÇÃO, L. G.; BORGES, A. S. Dermatological and morphological findings in quarter horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 547-e96, dez. 2014a. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/vde.12145>.

BADIAL, P. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; WINAND, N. J.; BORGES, A. S. Allele frequency of hereditary equine regional dermal asthenia in American Quarter horses in Brazil determined by quantitative real-time PCR with high resolution melting analysis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 306–307, fev. 2014b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.008>.

BADIAL, P. R.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; CAGNINI, D. Q.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; COOLEY, A. J.; CUNHA, P. H. J.; KITCHELL, B. E.; CONCEIÇÃO, L. G.; MOCHAL, C. a.; BORGES, A. S. Marjolin's Ulcer in Two Horses with Hereditary Equine Regional Dermal Asthenia. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 7, p. 515–522, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612001013>.

BECKER, U.; TIMPL, R.; HELLE, O.; PROCKOP, D. J. Amino-terminal extensions on skin collagen from sheep with a genetic defect in conversion of procollagen into collagen. **Biochemistry**, v. 15, n. 13, p. 2853–2862, jun. 1976. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00658a024>.

BEIGHTON, P.; PAEPE, A. De; STEINMANN, B.; TSIPOURAS, P.; WENSTRUP, R. J. Ehlers-Danlos syndromes: Revised nosology, Villefranche, 1997. **American Journal of Medical Genetics**, v. 77, n. 1, p. 31–37, 28 abr. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9557891>.

BIRK, D. E.; BRUCKNER, P. Collagen suprastructures. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 185–205, 2005.

BOGAERT, L.; POUCKE, M.V.; DE BAERE, C.; PEELMAN, L.; GASTHUYS, F.;

MARTENS, A. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. **BMC Biotechnology** 2006, 6:24. DOI:10.1186/1472-6750-6-24.

BORGES, A. S.; CONCEIÇÃO, L. G.; ALVES, A. L. G.; FABRIS, V. E.; PESSOA, M. A. Hereditary equine regional dermal asthenia in three related Quarter horses in Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 125–130, 2005.

BOWSER, J. E.; ELDER, S. H.; PASQUALI, M.; GRADY, J. G.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; WILLS, R.; SWIDERSKI, C. E. Tensile properties in collagen-rich tissues of Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA). **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 2, p. 216–222, 2014.

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K. C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 78, n. 1, p. 43–48, 2003.

BRENNEISEN, P.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 973, n. 1, p. 31–43, nov. 2002. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04602.x>.

BRINCKMANN, J. Collagens at a glance. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 1–6, 2005.

BROUNTS, S. H.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; BLACK, S. S. Zonal dermal separation: A distinctive histopathological lesion associated with hyperelastosis cutis in a Quarter Horse. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 219–224, 2001.

BROWN, P. J.; YOUNG, R. D.; CRIPPS, P. J. Abnormalities of collagen fibrils in a rabbit with a connective tissue defect similar to Ehlers-Danlos syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n. 3, p. 346–350, nov. 1993. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003452889390105O>.

BURROWS, N. P. The molecular genetics of the Ehlers-Danlos syndrome. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 24, n. 2, p. 99–106, 1999.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. **J Mol Endocrinol** 2005, 34:597-601.

BYERS, P. Collagens: building blocks at the end of the development line. **Clinical Genetics**, v. 58, n. 4, p. 270–279, 24 dez. 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0004.2000.580404.x>.

BYERS, P. H. Inherited disorders of collagen gene structure and expression. **Am J Med Genet**, v. 34, n. 1, p. 72–80, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2683783>.

CASTORI, M. Ehlers-danlos syndrome, hypermobility type: an underdiagnosed hereditary connective tissue disorder with mucocutaneous, articular, and

systemic manifestations. **ISRN dermatology**, v. 2012, p. 751768, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3512326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CAPPELLI, K.; FELICETTI, M.; CAPOMACCIO, S.; SPINSANTI, G.; SILVESTRELLI, M.; SUPPLIZI, A. V. Exercise induced stress in horses: Selection of the most stable eference genes for quantitative RT-PCR normalization. **BMC Molecular Biology** 2008, 9:49. DOI:10.1186/1471-2199-9-49.

CAWSTON, T. E.; WILSON, A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 983–1002, 2006.

COUNTS, D. F.; BYERS, P. H.; HOLBROOK, K. A.; HEGREBERG, G. A. Dermatosparaxis in a Himalayan Cat: I. Biochemical Studies of Dermal Collagen. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 74, n. 2, p. 96–99, 1980. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12519991%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15457136>.

DE PAEPE, A.; MALFAIT, F. The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. **Clinical Genetics**, v. 82, n. 1, p. 1–11, 2012.

ETO, H.; SUGA, H.; AOI, N.; KATO, H.; DOI, K.; KUNO, S.; TABATA, Y.; YOSHIMURA, K. Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 2, p. 214–223, 26 fev. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.127>.

FINNO, C. J.; SPIER, S. J.; VALBERG, S. J. Equine diseases caused by known genetic mutations. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 3, p. 336–347, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.03.016>.

FISHER, G. J.; DATTA, S. C.; TALWAR, H. S.; WANG, Z.-Q.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v. 379, n. 6563, p. 335–339, 25 jan. 1996. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/379335a0>.

FISHER, G. J.; WANG, Z. Q.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Pathophysiology of premature skin ageing induced by ultraviolet light. **N. Engl. J. Med**. 337, 1419–1428. 1997

FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Molecular Mechanisms of Photoaging and its Prevention by Retinoic Acid: Ultraviolet Irradiation Induces MAP Kinase Signal Transduction Cascades that Induce Ap-1-Regulated Matrix Metalloproteinases that Degrade Human Skin In Vivo. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 61–68, ago. 1998. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087002415301945>.

FISHER, G. J.; WANG, Z.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES,

J. J. Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 20, p. 1419–1429, 13 nov. 1997. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199711133372003>.

FISHER, G. J.; CHOI, H-C.; BATA-CSORGO, Z.; SHAO, Y.; DATTA, S.; WANG, Z-Q.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Ultraviolet Irradiation Increases Matrix Metalloproteinase-8 Protein in Human Skin In Vivo. **J Invest Dermatol** 117:219-226, 2001.

FROHLICH, C. **Space Science Reviews** 125, 53 (2006).

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.

GHARBIYA, M.; MORAMARCO, A.; CASTORI, M.; PARISI, F.; CELLETTI, C.; MARENCO, M.; MARIANI, I.; GRAMMATICO, P.; CAMEROTA, F. Ocular features in joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type: A clinical and in vivo confocal microscopy study. **American Journal of Ophthalmology**, v. 154, n. 3, p. 593–600.e1, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2012.03.023>.

GOGLY, B.; GROULT, N.; HORNEBECK, W.; GODEAU, G.; PELLAT, B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. **Analytical biochemistry**, v. 255, n. 2, p. 211–6, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269797923186>.

GÓMEZ, J.M. R.; CARLESSO, F.; VIEIRA, L. E.; DA SILVA, L. A irradiância solar: conceitos básicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, vol. 40, nº 3, e3312 (2018).

GRADY, J. G.; ELDER, S. H.; RYAN, P. L.; SWIDERSKI, C. E.; RASHMIR-RAVEN, A. M. Biomechanical and molecular characteristics of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 591–599, 2009.

GRAVES, K. T.; HENNEY, P. J.; ENNIS, R. B. Partial deletion of the LAMA3 gene is responsible for hereditary junctional epidermolysis bullosa in the American Saddlebred Horse. **Animal Genetics**, v. 40, n. 1, p. 35–41, 2009.

GRENACHE, D. G.; ZHANG, Z.; WELLS, L. E.; SANTORO, S. A.; DAVIDSON, J. M.; ZUTTER, M. M. Wound Healing in the α2β1 Integrin-Deficient Mouse: Altered Keratinocyte Biology and Dysregulated Matrix Metalloproteinase Expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 2, p. 455–466, fev. 2007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15332681>.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: a Tissue Culture Assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, n. 6, p. 1014–1022, 1962.

GUNSON, D. E. Dermal Collagen Degradation and Phagocytosis. **Archives of Dermatology**, v. 120, n. 5, p. 599, 1 maio 1984. Disponível em: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1984.01650410041013>.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; INADA, M.; BALBÍN, M.; FUEYO, A.; PITIOT, A. S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S. D.; NOËL, A.; WERB, Z.; KRANE, S. M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PUENTE, X. S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 10, p. 2580–2591, 1 ago. 2007. Disponível em: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.06-7860com>.

HARDY, M. H.; FISHER, K. R.; VRABLIC, O. E.; YAGER, J. A.; NIMMO-WILKIE, J. S.; PARKER, W.; KEELEY, F. W. An inherited connective tissue disease in the horse. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 59, n. 2, p. 253–62, ago. 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3404977>.

HATTORI, N.; MOCHIZUKI, S.; KISHI, K.; NAKAJIMA, T.; TAKAISHI, H.; D'ARMIENTO, J.; OKADA, Y. MMP-13 Plays a Role in Keratinocyte Migration, Angiogenesis, and Contraction in Mouse Skin Wound Healing. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 533–546, 2009.

HOLBROOK, K. a; BYERS, P. H. Structural abnormalities in the dermal collagen and elastic matrix from the skin of patients with inherited connective tissue disorders. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 79, p. 7s–16s, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806400%5Cnhttp://www.nature.com.proxy.lib.ohio-state.edu/jid/journal/v79/n1s/full/jid19823a.html>.

ISHIKAWA, Y.; VRANKA, J. A.; BOUDKO, S. P.; POKIDYSHEVA, E.; MIZUNO, K.; ZIENTEK, K.; KEENE, D. R.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; NAGATA, K.; WINAND, N. J.; BÄCHINGER, H. P. Mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in american quarter horse does not affect peptidylprolyl cis-trans isomerase activity but shows altered cyclophilin b-protein interactions and affects collagen folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 22253–22265, 2012.

KÄHÄRI, V.-M.; SAARIALHO-KERE, U. Trendsin Molecular Medicine: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Annals of Medicine**, v. 31, n. 1, p. 34–45, 8 jan. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631221>.

KAWAGUCHI, Y.; TANAKA, H.; OKADA, T.; KONISHI, H.; TAKAHASHI, M.; ITO, M.; ASAI, J. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. **Archives for dermatological research. Archiv fur dermatologische Forschung**, v. 288, n. 1, p. 39–44, 1996.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix

metalloproteases. **Amino Acids** (2011) 41:271–290. DOI 10.1007/s00726-010-0689-x.

KOHN, C. W.; JOHNSON, G. C.; GARRY, F.; JOHNSON, C. W.; MARTIN, S.; SCOTT, D. W. Mechanobullous disease in two Belgian foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 4, p. 297–301, jul. 1989. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3306.1989.tb02173.x>.

KOIDE, T.; NAGATA, K. Collagen biosynthesis. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 85–114, 2005.

KOZLOV, G.; BASTOS-ARISTIZABAL, S.; MAATTANEN, P.; ROSENAUER, A.; ZHENG, F.; KILLIKELLY, A.; TREMPE, J.-F.; THOMAS, D. Y.; GEHRING, K. Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35551–35557, 12 nov. 2010. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.160101>.

KUCHARZ, E. J. **The collagens: biochemistry and pathophysiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992.

LAHMANN, C.; YOUNG, A. R.; WITTERN, K.; BERGEMANN, J. Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 6, p. 657, 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1562/0031-8655(2001)073%3C0657:IOMFMM%3E2.0.CO;2>.

LEPHART, E. D. Human skin gene expression doesn't correlate with protein expression? Unless both parameters are quantified. **J Cosmet Dermatol.** 2017;1–2. DOI: 10.1111/jocd.12362.

LERNER, D. J.; MCCRAKEN, M. D. Hyperelastosis cutis in two horses. **Am. Anim. Hosp. Ass**, v. 2, p. 350–352, 1978.

LIETO, L. D.; SWERCZEK, T. W.; COTHRAN, E. G. Equine Epitheliogenesis Imperfecta in Two American Saddlebred Foals Is a Lamina Lucida Defect. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 576–580, 2002. Disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/39/5/576.abstract>.

LITSCHAUER, B.; PALM, F.; AURICH, C.; BUCHNER, H. H. F.; HORVATH-UNGERBÖCK, C. Hereditary equine regional dermal asthenia in two Quarter horses in Austria. **Wiener Tierarztliche Monatsschrift**, v. 97, n. 1–2, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MADLENER, M.; PARKS, W. C.; WERNER, S. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Physiological Inhibitors (TIMPs) Are Differentially Expressed during Excisional Skin Wound Repair. **Experimental Cell Research**, v. 242, n. 1, p. 201–210, jul. 1998. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482798940496>.

MARSHALL, V. L.; SECOMBE, C.; NICHOLLS, P. K. Cutaneous asthenia in a Warmblood foal. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 3, p. 77–81, 2011.

MINOR, R. R. Collagen metabolism: A Comparison of Diseases of Collagen and Diseases Affecting Collagen. **American Journal of Pathology**, v. 98, n. 1, p. 225–280, 1980.

MIRAGLIOTTA, V.; LEFEBVRE-LAVOIE, J.; LUSSIER, J. G.; THEORET, C. L. Equine ANXA2 and MMP1 expression analyses in an experimental model of normal and pathological wound repair. **Journal of Dermatological Science**, v. 51, n. 2, p. 103–112, ago. 2008. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181108000935>.

MOCHAL, C. A.; MILLER, W. W.; COOLEY, A. J.; LINFORD, R. L.; RYAN, P. L.; RASHMIR-RAVEN, A. M. Ocular findings in Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 3, p. 304–10, 1 ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673112>.

MONTHOUX, C.; DE BROT, S.; JACKSON, M.; BLEUL, U.; WALTER, J. Skin malformations in a neonatal foal tested homozygous positive for Warmblood Fragile Foal Syndrome. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 12, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4327794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 558–564, out. 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067404001097>.

MYLLYHARJU, J. Intracellular post-translational modifications of collagens. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 115–147, 2005.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens , modifying enzymes and their mutations in humans , flies and worms. v. 20, n. 1, p. 33–43, 2004.

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 5, p. 1135–1149, 2000.

NOMURA, M.; HOSAKA, Y.; KASASHIMA, Y.; UEDA, H.; TAKEHANA, K.; KUWANO, A.; ARAI, K. Active Expression of Matrix Metalloproteinase-13 mRNA in the Granulation Tissue of Equine Superficial Digital Flexor Tendinitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 6, p. 637–639, 2007. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/69.637?from=CrossRef>.

NUSGENS, B. V.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; HERMANNS-LÊ, T.; DE PAEPE, A.; NUYTINCK, L.; PIÉRARD, G. E.; LAPIÈRE, C. M. Evidence for a relationship between Ehlers–Danlos type VII C in humans and bovine dermatosparaxis. **Nature Genetics**, v. 1, n. 3, p. 214–217, jun. 1992. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng0496-417>.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; BADIAL, P. R.; CUNHA, P. H. J.; CRUZ, T. F.; ARAÚJO, J. P.; DIVERS, T. J.; WINAND, N. J.; BORGES, A. S. Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 1–2, p. 34–42, 2010.

PACIELLO, O.; LAMAGNA, F.; LAMAGNA, B.; PAPPARELLA, S. Ehlers-Danlos—Like Syndrome in 2 Dogs: Clinical, Histologic, and Ultrastructural Findings. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 1, p. 13–18, mar. 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.2003.tb00306.x>.

PIRILÄ, E.; SHARABI, A.; SALO, T.; QUARANTA, V.; TU, H.; HELJASVAARA, R.; KOSHIKAWA, N.; SORSA, T.; MAISI, P. Matrix metalloproteinases process the laminin-5 ?? 2-chain and regulate epithelial cell migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 4, p. 1012–1017, 2003.

RAMSHAW, J. a; SHAH, N. K.; BRODSKY, B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. **Journal of structural biology**, v. 122, n. 1–2, p. 86–91, 1998.

RASHMIR-RAVEN, A. Heritable Equine Regional Dermal Asthenia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 29, n. 3, p. 689–702, dez. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074907391300059X>.

RASHMIR-RAVEN, A.; LAVAGNINO, M.; SEDLAK, A.; GARDNER, K.; ARNOCZKY, S. Increased susceptibility of skin from HERDA (Hereditary Equine Regional Dermal Asthenia)-affected horses to bacterial collagenase degradation: A potential contributing factor to the clinical signs of HERDA. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 6, 2015.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; SPIER, S. J. Hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA) in Quarter Horses: A review of clinical signs, genetics and research. **Equine Veterinary Education**, v. 27, n. 11, p. 604–611, 2015.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; WINAND, N J; READ, R. W.; HOPPER, R. M.; RYAN, P. L.; POOLE, M. H.; ERB, H. N. Equine Hyperelastosis Cutis Update. **50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2004, Denver, Colorado,** n. January, p. 1409–1204, 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268337943>.

RENDLE, D. I.; DURHAM, A. E.; SMITH, K. C. Hereditary equine regional dermal asthenia in a quarter horse bred in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 162, n. 1, p. 20–22, 2008. Disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/162/1/20.full>.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 4, p. 705–720, 2002.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.73>.

SCHUBERT-UNKMEIR, A.; KONRAD, C.; SLANINA, H.; CZAPEK, F.; HEBLING, S.; FROSCH, M. Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. **PLoS Pathog**., v. 6, n. 4, 2010.

SEQUEIRA, J. L.; ROCHA, N. S.; BANDARRA, E. P.; FIGUEIREDO, L. M.; EUGENIO, F. R. Collagen dysplasia (cutaneous asthenia) in a cat. **Veterinary pathology**, v. 36, n. 6, p. 603–606, 1999.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 929–958, 2010.

SMITS, K.; GOOSSENS, K.; SOOM, A. V.; GOVAERE, J.; HOOGEWIJS, M.; VANHAESEBROUCK, E.; GALLI, C.; COLLEONI, S.; VANDESOMPELE, J.; PEELMAN, L. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. **BMC Research Notes** 2009, 2:246. DOI:10.1186/1756-0500-2-246.

SOLOMONS, B. Equine cutis hyperelastica. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 6, p. 541–542, nov. 1984. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3306.1984.tb02014.x>.

STEINMANN, B.; BRUCKNER, P.; SUPERTI-FURGA, A. Cyclosporin a slows collagen triple-helix formation in vivo: Indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 2, p. 1299–1303, 1991.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 463–516, nov. 2001. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.

TALWAR, H. S., GRIFFITHS, C. E. M., FISHER, G. J., HAMILTON, T. A., VOORHEES, J. J. Reduced Type I and Type III Procollagens Photodamaged Adult Human Skin. J**ournal of Investigative Dermatology,** v. 105, n 2, 1995, p.285-290.

TRYON, R. C.; PENEDO, M. C. T.; MCCUE, M. E.; VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; FAMULA, T. R.; WAGNER, M. L.; JACKSON, M.; HAMILTON, M. J.; NOOTEBOOM, S.; BANNASCH, D. L. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 1, p. 120–125, 2009.

TRYON, R. C.; WHITE, S. D.; BANNASCH, D. L. Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse. **Genomics**, v. 90, n. 1, p. 93–102, 2007.

TRYON, R. C.; WHITE, S. D.; FAMULA, T. R.; SCHULTHEISS, P. C.; HAMAR, D. W.; BANNASCH, D. L. Inheritance of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66,

n. 3, p. 437–442, 2005.

URÍA, J. A.; JIMÉNEZ, M. G. BALBÍN, M.; FREIJE, J. M. P.; LÓPEZ-OTÍN, C. Differential Effects of Transforming Growth Factor-b on the Expression of Collagenase-1 and Collagenase-3 in Human Fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry.** vol. 273, n. 16, pp. 9769–9777, 1998.

VEIT, G.; KOBBE, B.; KEENE, D. R.; PAULSSON, M.; KOCH, M.; WAGENER, R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3494–3504, 2006.

WAGUESPACK, R. W.; KEMPPAINEN, R. J.; COCHRAN, A.; LIN, H. C.; BELKNAP, J. K. Increased expression of MAIL, a cytokine-associated nuclear protein, in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis. **Equine Veterinary Journal,** v. 36, n. 3, p. 285-291, 2004. disponivel em: <https://doi.org/10.2746/0425164044877099>.

WALTERS, B. D.; STEGEMANN, J. P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1488–1501, abr. 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113004303>.

WANG, M.; CHARAREH, X. L.; ZHONG LI. Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Vol 2019, Article ID 8135985, 14 pages. https://doi.org/10.1155/2019/8135985.

WANG, L.; PAWLAK, E. A.; JOHNSON, P. J.; BELKNAP, J. K.; ALFANDARI, D.; BLACK, S. J. Expression and activity of collagenases in the digital laminae of horses with carbohydrate overload-induced acute laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 1, p. 215–222, 2014.

WHITE, S. D.; AFFOLTER, V. K.; BANNASCH, D. L.; SCHULTHEISS, P. C.; HAMAR, D. W.; CHAPMAN, P. L.; NAYDAN, D.; SPIER, S. J.; ROSYCHUK, R. A. W.; REES, C.; VENEKLASEN, G. O.; MARTIN, A.; BEVIER, D.; JACKSON, H. A.; BETTENAY, S.; MATOUSEK, J.; CAMPBELL, K. L.; IHRKE, P. J. Hereditary equine regional dermal asthenia (’hyperelastosis cutis’) in 50 horses: Clinical, histological, immunohistological and ultrastructural findings. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 207–217, 2004.

WHITE, S. D.; AFFOLTER, V. K.; SCHULTHEISS, P. C.; BALL, B. A.; WESSEL, M. T.; KASS, P.; MOLINARO, A. M.; BANNASCH, D. L.; IHRKE, P. J. Clinical and pathological findings in a HERDA-affected foal for 1.5 years of life. **Veterinary dermatology**, v. 18, p. 36–40, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222238>.

WHITE, S. D.; BOURDEAU, P. Prevalence of the mutation in cyclophilinB (PPIB), a causal candidate gene for HERDA, among Quarter Horses in France. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 206–208, 2011.

WITZIG, P.; SUTER, M.; WILD, P.; RAO, V. H.; STEINMANN, B.; VON ROTZ, A.

Dermatosparaxis in a foal and a cow--a rare disease? **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 126, n. 11, p. 589–96, nov. 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6515392>.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. T**he British Journal of Dermatology**, vol. 157, no. 5, pp. 874–887, 2007.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART, JR., C. N., Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics 2006, 7, 85.

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista " Veterinary Dermatology ", cujas normas estão no ANEXO 1.

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO SOLAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DA MMPP1, MMP8 E MMP13 NA PELE DE CAVALOS COM ASTENIA DÉRMICA REGIONAL HEREDITÁRIA EQUINA (HERDA)

RESUMO

Introdução: Astenia cutânea regional hereditária equina é uma afecção genética, autossômica recessiva em cavalos da raça quarto de milha, caracterizada por animais de pele frágil, hiperextensivel que lacera facilmente, os animais apresentam feridas cutâneas, principalmente na região dorsal do corpo. É causada por uma mutação no gene que codifica a Ciclofilina B, ocasionando anormalidades na síntese de colágeno nos animais afetados.

Hipótese/objetivo: A derme dos animais afetados é mais sensível a ação de colagenases e podem ter uma atividade aumentada quando expostos a radiação solar o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da radiação solar na expressão gênica de colagenases pele de equinos afetados e comparar com animais normais.

Animais: Foram utilizados seis equinos no grupo afetados (GA), positivos no teste molecular para HERDA, e seis equinos normais para o grupo controle (GC), ambos os grupos com idade, porte e cor de pelagens semelhantes.

Métodos: Todos os animais viviam em condições à campo e foram submetidos a restrição de radiação solar e posteriormente expostos ao sol novamente. Foram colhidas amostras de pele por biópsias incisionais da região torácica dorsal e ventral de todos os animais em seis momentos: M0, antes da fase de restrição à luz solar; M1, 15 dias de restrição ao sol; M2, 30 dias de restrição ao sol; M3, final do 1º dia de exposição ao sol; M4, 3º dia de exposição; M5, 15º dia de exposição. A expressão gênica relativa foi realizada através de qPCR em tempo real.

Resultados: No M4 houve aumento significativo ($P<0,05$) da expressão de MMP1 na pele dorsal no GA e no GC e ventral no GC; aumento na expressão de MMP8 em ventre do GA e nenhuma mudança significativa na expressão gênica de MMP13 em nenhum dos grupos. A pele de dorso expressou mais MMP1 que a ventral em GA e GC e o dorso do GA apresentou quantidade maior de transcritos de MMP1 que no dorso do GC.

Conclusão e importância clínica: Houve influência da radiação solar na expressão de transcritos de colagenases na pele de equinos com HERDA e normais. Todavia, houve maior expressão no dorso de animais afetados o que é importante, pois comprova a hipótese inicial, aonde fica indicado que no manejo dos animais acometidos deve-se evitar a exposição a radiação solar, pelo menos nos períodos de maior incidência, além de demonstrar um padrão de degradoma cutâneo semelhante aos humanos.

Palavras chave: HERDA, equinos, metaloproteinases de matriz, qPCR

INTRODUÇÃO

A Astenia cutânea regional dérmica hereditária (HERDA) é uma doença genética de caráter autossômico recessivo em equinos da raça Quarto de Milha (QM) (TRYON et al., 2005) e raças compostas pelo QM (WHITE et al., 2004; TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007). Caracteriza-se clinicamente por animais com pele fina, frouxa e hiperextensível que lacera facilmente ao menor trauma causando extensas cicatrizes, de difícil reparação, (SOLOMONS, 1984; WHITE et al., 2004; BORGES et al., 2005).

A HERDA ocorre devido mutação no gene que codifica a Ciclofilina B (CypB), uma proteína da famílias das peptidilprolil isomerases (PPI) responsável pela estruturação da tripla hélice da molécula de colágeno (KOIDE; NAGATA, 2005) e portanto, ocasiona efeitos deletérios nesta proteína estrutural (TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007; ISHIKAWA et al., 2012; RASHMIR-RAVEN, 2013). Além de comprometer a estrutura dérmica, os animais afetados podem apresentar alterações oculares e na composição de tendões e ligamentos (GRADY et al., 2009; MOCHAL et al., 2010; BOWSER et al., 2014; BADIAL et al., 2015).

A denominação de astenia dérmica regional foi adotada devido uma maior frequência das lesões na região dorsal (WHITE et al., 2004), todavia outros trabalhos demonstram que, em animais afetados, a pele é mais fina e hiperextensível com presença de lesões em quase todo o corpo (GRADY et al., 2009; BADIAL et al., 2014). A maior ocorrência de feridas na região dorsal também foi atribuída a uma maior exposição a luz solar desta região (RASHMIR-RAVEN et al., 2004; GRADY et al., 2009; RASHMIR-RAVEN, 2013; RASHMIR-RAVEN; SPIER, 2015). Esta hipótese foi baseada em pesquisas anteriores, onde pesquisadores demostraram que a produção de colagenase induzida pela radiação de raios ultravioleta (solar) resultou em degradação das fibras de colágeno na pele de humanos (FISHER et al., 1996; FISHER et al., 1997; BRENNEISEN et al., 2002).

As colagenases são enzimas conhecidas como Metaloproteinases de Matriz (MMP), que constituem uma grande família de enzimas que tem a finalidade de degradar vários componentes da matriz extracelular (MEC) (NELSON; FINGLETON; ROTHENBERG, 2000; CAWSTON; WILSON, 2006).

São proteinases zinco/cálcio dependentes que tem fundamental importância na degradação da MEC, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos da remodelação tecidual (STERNLICHT; WERB, 2001; MOTT; WERB, 2004). Embora várias MMP's estejam expressas na pele de mamíferos, apenas três tem atividade colagenolítica (colagenases), a MMP1 (colagenase intersticial), MMP8 (colagenase neutrofílica) e MMP13 (colagenase 3), podendo degradar colágeno fibrilar tipo I e III (BRENNAN et al., 2003).

Um trabalho mais recente demonstrou que a pele de cavalos com HERDA é mais hiperextensível quando exposta a colagenase bacteriana do que a pele de cavalos normais (RASHMIR-RAVEN et al., 2015). Tais achados deram suporte a hipótese de que a microestrutura das fibras dos animais afetados provê uma superfície de contato mais ampla para ação enzimática, devido a desorganização histológica e estrutural (RASHMIR-RAVEN; HOPPER, R; RYAN, 2004; WHITE et al., 2004; BADIAL et al., 2014).

Diante da hipótese que a pele de equinos acometidos por HERDA é mais susceptível a ação de colagenase (RASHMIR-RAVEN et al., 2015) e que a radiação solar pode aumentar a ação de MMP´s no colágeno dérmico, conforme descrito em humanos (RITTIÉ; FISHER, 2002; BRENNAN et al., 2003), este trabalho teve como objetivo realizar um estudo caso controle, casualizado, para avaliar a influência da radiação solar na expressão gênica das colagenases MMP1, MMP8 e MMP13 na pele de equinos afetados por HERDA de acordo com o grau e exposição dos animais à radiação solar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Esta pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu sob o protocolo n° 0026/2017.

Foram utilizados 10 equinos da raça Quarto de Milha (QM), duas fêmeas e oito machos, com peso médio de 331,4±51,3 Kg, divididos e dois grupos experimentais: Grupo afetado (GA) contendo cinco animais (quatro machos e uma fêmea) com peso médio de 333,17±53,49Kg, clinicamente afetados e positivos para o teste genético (TRYON; WHITE; BANNASCH, 2007); Grupo Controle (GC) com cinco animais (quatro machos e uma fêmea) hígidos, não

afetados pesando em média 329,67±54,20Kg, com idade e cor da pelagem relacionadas ao GA.

Os dois grupos de animais foram submetidos a uma fase de restrição e posteriormente a uma fase de exposição à luz solar (Figura 1), todo o período do experimento ocorreu entre os meses de dezembro/2017 e janeiro/2018. No período de restrição, todos os animais foram mantidos em baias individuais, protegidos integralmente da luz solar, durante 30 dias. Após o período de restrição, todos os animais foram mantidos em piquetes abertos, aos pares (afetado e normal), sem qualquer proteção contra radiação solar, em período integral. Em todas as etapas, a radiação solar foi aferida com aparelho portátil MES-100 (INSTRUTHERM Instrumentos de Medição Ltda. São Paulo – SP), segundo as instruções do fabricante. Em ambas as etapas todos receberam feno de gramínea *Coast cross* e água *ad libidum*, além de suplementação com concentrado e sal mineral.

A colheita das amostras ocorreu em seis momentos, ao longo do período de tratamento: M0, previamente a fase de restrição ao sol; M1, aos 15 dias de restrição à radiação solar; M2, 30 dias de restrição à radiação solar; M3, ao fim do primeiro dia de exposição à radiação solar; M4, final do terceiro dia de exposição à radiação solar; M5, ao 15º dia de exposição solar (Figura 1).

Em M3 e M4 a radiação solar foi aferida no dorso e no ventre dos animais, para observar a quantidade de radiação que cada região foi exposta.

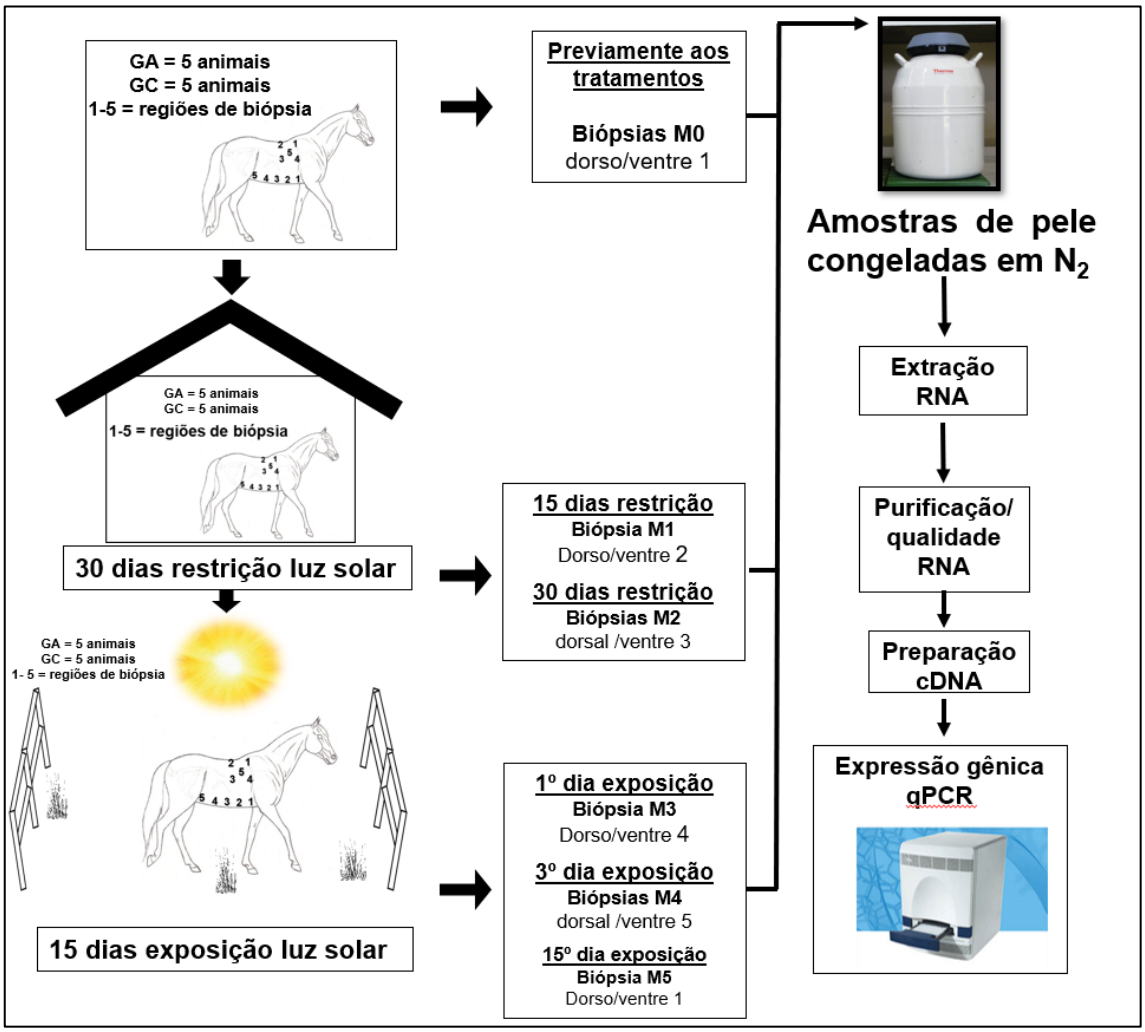


Figura 1. Desenho experimental demonstrando os pontos determinados para realização das biópsias em cada momento, o esquema de restrição e exposição à radiação solar que os grupos de animais foram submetidos, além do esquema de procedimentos para as análises em laboratório.

Colheita das amostras

Foram realizadas biopsias de pele de regiões do dorso e do ventre de todos os animais, mantendo uma distância mínima de 15 cm entre os pontos de biópsia nas seguintes regiões: paramediana à coluna vertebral, 10 cm da linha média dorsal, das regiões da cernelha e 15ª vertebra torácica para amostras de dorso; paramediana, cinco cm da linha média ventral, das regiões external, umbilical e púbica. Foram determinadas essas regiões devido a espessura da pele ter menor variância (BADIAL et al., 2014).

Foi utilizada biópsia incisional para colheita de pele íntegra (2cm X 1cm) realizadas após sedação dos animais com cloridrato de detomidina (DormiunV®

- AGENER UNIÃO Saúde Animal - São Paulo, SP.) na dose de 0,02 $mg.kg^{-1}$ IV e anestesia local da pele com lidocaína 2%(Xylestesin®; Cristália, São Paulo, SP). Todas as amostras foram congeladas imediatamente pós colheita em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a - 80 ºC para os testes moleculares.

Extração RNA total e produção cDNA

Foram utilizados 50mg de pele contendo epiderme e derme, o tecido foi fracionado e macerado em tubos plásticos com esferas de cerâmica Tissue Grinding CKMix50-R (Bertin-technologies, Rockville, MD 20850, USA) em homogeneizador automático Precellys® 24 (Bertin-technologies, Rockville, MD 20850, USA) à 6.500 RPM em três ciclos de 30 segundos de agitação com intervalos de 30 segundos. Para as demais etapas de extração e purificação, bem como tratamento com DNase, foi utilizado kit comercial SV total RNA Isolation System (PROMEGA Corporation Madison, WI 53711-5399 USA), segundo recomendações do fabricante.

Após a remoção do DNA genômico foi realizada a quantificação do RNA de todas as amostras em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific™; Wilmington, DE, USA) a 260nm, a relação 260/280nm foi utilizada para avaliar a pureza e qualidade relativa das amostras (1,8 a 2,2). Uma amostra de pele de um equino foi utilizada como padrão, tanto na fase de testes e padronização das concentrações dos *primers* quanto na construção das curvas padrão para análise da eficiência na reação de qPCR, o RNA extraído desta amostra padrão foi analisada quanto a sua pureza no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA 95051, USA).

Para a confecção do cDNA foi utilizado sistema de transcriptase reversa ImProm-II™ (Reverse Transcription System - Promega Corporation. Madison, WI 53711-5399 USA), segundo recomendações do fabricante. Para tal, foram utilizados 800ng de RNA total, 1,5µg de *random primers* e H_2O livre de nucleases (NF) qsp para 15 µL, esse mix foi submetido a incubação à 70ºC durante cinco minutos e em seguida a 4ºC por mais cinco minutos. Para o preparo do mix da enzima foram utilizados 12µL de tampão da enzima, 12µL de $MgcL_2$, 3µL mix dNTP´s, 1,5µL de RNAsin, 3µL de transcriptase reversa e H_2O NF qsp para volume de 45µL. O mix da enzima foi adicionado ao mix da amostra totalizando

um volume final para a reação de 60µL. A reação da transcriptase reversa ocorreu em termociclador, sob as seguintes condições: Anelamento a 25ºC durante 5 minutos, extensão à 42ºC durante 60 minutos, inativação da enzima à 85ºC durante 3 minutos e resfriamento à 4ºC. Em seguida os produtos da reação foram armazenados à -20°C.

Expressão gênica de MMP1, MMP8 e MMP13 da pele de equinos

A expressão gênica relativa das colagenases e do gene endógeno da *β-actina* equina da pele de equinos de ambos os grupos foi realizada pela técnica de qPCR. A sequência genômica dos primers para os genes alvos (MMP1, MMP8 e MMP13 equinos) e normalizador (β-actina) foram obtidas com auxílio de ferramenta disponível na internet (www.ncbi.nlm.nih.gov) e as sequências dos primers específicos para genes alvo e normalizador foram gerados por meio da utilização da ferramenta online PRIMER-BLAST disponível na plataforma do NCBI. As sequências dos iniciadores dos genes alvo e endógeno utilizados, dispostos na Tabela 1, com tamanho entre 20 e 23 bases e temperatura de hibridização entre 59 e 64ºC, e seus respectivos produtos com tamanhos entre 108 e 207 pares de bases (pb) ocupando posições exon-exon. A especificidade de cada conjunto de primers, para ambos os genes, foi verificado com o auxílio do programa BLAST disponível no website do NCBI.

Tabela 1. Sequência dos conjuntos de *primers* dos genes alvo (MMP1, MMP8 e MMP13 equino) e endógeno (β-actina equina) utilizados na reação de qPCR. O número de acesso corresponde a sequência do RNAm para os respectivos genes no banco de dados do NCBI.

Nº acesso NCBI	Nome do primer	Sequência gênica (5'->3')	Produto (pb)
NM_001081847.2	MMP1 Foward MMP1 Reverse	GAACACACACCTGACCTACAG GGTGAGACATTACTCCAGAGTTG	108
XM_005611538.2 (x1) e XM_001498836.3 (x2)	MMP8 Foward MMP8 Reverse	CCTTTCCAGTACCTCCTGAATC CTAGTGCTGTTCTTCCTTGC	121
NM_001081804.1	MMP13 Foward MMP13 Reverse	GGAGATGAAGACCCGAACCC GGCAGCATCAATACGGTTGG	207
NM_001081838.1	β-actina Foward β-actina Reverse	GCACCACACCTTCTACAACG ACATGATCTGGGTCATCTTC	113

A expressão gênica das colagenases foi realizada utilizando o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde o gene da *β-actina*

equina foi utilizado como gene endógeno e o ΔcT das amostras de dorso no M0 como referência para se obter o $\Delta\Delta$cT utilizado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas no equipamento 7500 FAST Real Time System (Applied Biosystems™ - California 94404, USA), em cada placa utilizou-se amostra positiva (cDNA utilizado nas curvas padrão de eficiência) e um controle negativo sem cDNA (*no template*) para cada conjunto de primers.

Para as reações de qPCR foi utilizado kit comercial Gotaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI 53711 USA). Para tal, foram utilizados 02µL de cDNA, 300nM de *primers foward* e *reverse* do gene alvo MMP1 e endógeno β-actina, 400nM de cada iniciador (*foward* e reverse) para os genes alvos MMP8 e MMP13; 10µL de Gotaq® qPCR master mix e H_2O NF qsp para 20µL de volume final para reação. As condições das reações foram: 95ºC por 10 minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos de: 95ºC por 15 segundos, 60ºC durante 60 segundos para amplificação, seguido da curva de dissociação.

Análise estatística

Para avaliar as diferenças de concentração e de qualidade (relações de absorbâncias 260/280 e 260/230) do RNA total das amostras entre os grupos GA e GC, foi utilizado teste T de *Stundent*.

Os dados referentes a radiação solar nos momentos M3 e M4, após passarem pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, foram submetidos a análise de variância - ANOVA e teste a posteriori de Tukey.

Para se avaliar as diferenças de expressão relativa, de cada colagenase, entre os momentos estudados dentro de cada grupo foi utilizado ANOVA de medidas repetidas e Tukey a posteriori. Já as comparações entre regiões (dorso e ventre) dentro de cada grupo, ao longo do período experimental, foi utilizado ANOVA e teste de múltiplas comparações de Sidák. As diferenças entre grupos, tanto amostras de dorso quanto de ventre, foram avaliadas com teste T de *Stundent* para amostras independentes (YUAN et al., 2006).

Todas as análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 7.00® (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA 92108, USA) e as medidas

de tendência central e dispersão apresentadas em gráficos *boxplots*, as diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05.

RESULTADOS

Durante a fase de restrição foi possível manter os animais em ambiente fechado, totalmente protegidos de radiação solar, monitorada constantemente, e na fase de exposição foi possível observar diferença de significativa (P<0,05) na quantidade de radiação solar que as regiões de dorso e ventre dos animais foram expostas, conforme demonstrado na Figura 2, sendo que região dorsal no GA recebeu oito vezes mais radiação que a região ventral (P<0,05) em M3, e 11 vezes mais (P<0,01) em M4. No GC também houve exposição oito vezes maior da região dorsal em M3 (p<0,05) e 10 vezes maior em M4 (P<0,001).

As técnicas de colheita, preparação e extração do RNA das amostras de pele permitiu amostragem homogênea entre os grupos, pois não houve diferença significativa (P>0,05) entre as concentrações de RNA total e relações de absorbância das amostras entre GA e GC (Figura 3).

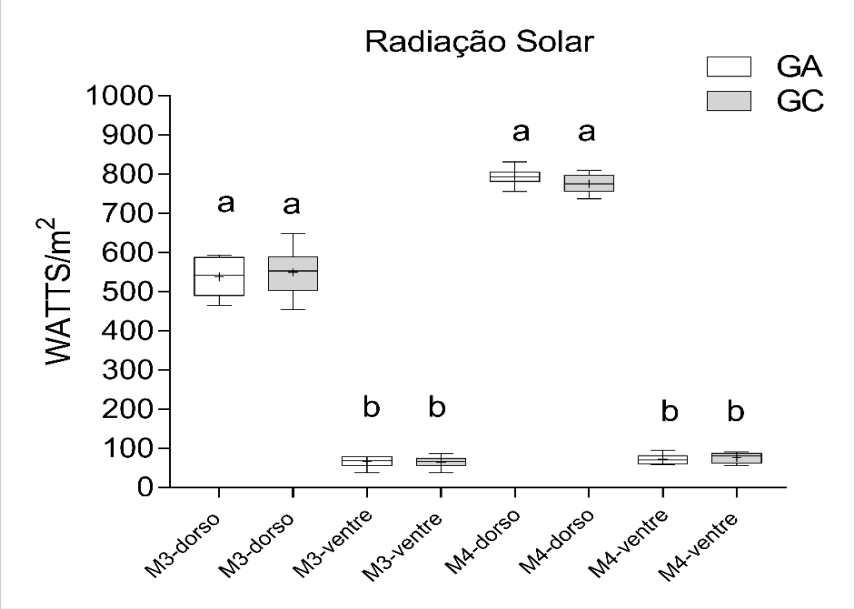


Figura 2. Boxplots demonstrando as diferenças entre exposição solar da região dorsal e ventral do GA e GC em M3 e M4. Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

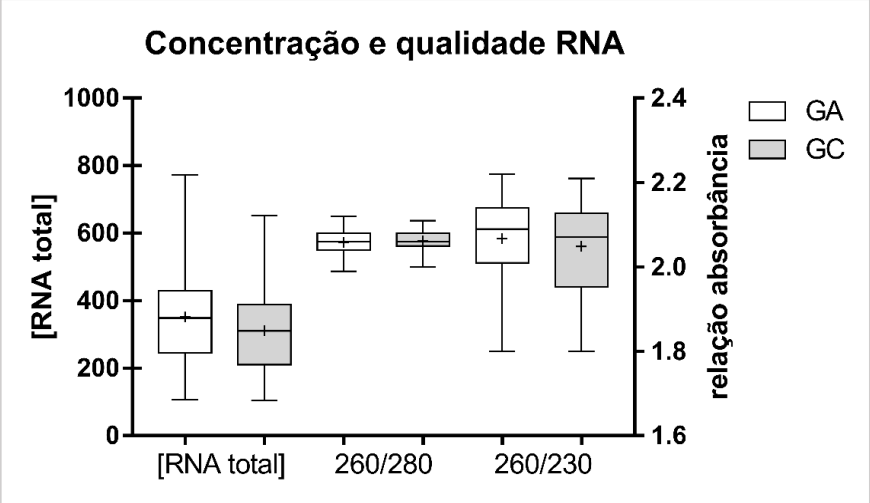


Figura 3. Boxplot demonstrando a variação da concentração de RNA total bem como a pureza pela análise da absorbância relativa das amostras de pele de equinos do grupo afetado (GA) e grupo controle (GC).

Nas análises de qPCR, observou-se que a radiação solar induziu variações significativas (P<0,05) na expressão gênica das colagenases MMP1 e MMP8, nos animais de ambos os grupos, quando expostos ao sol após um período de restrição a radiação solar. Foi evidenciado uma tendência a subexpressão de MMP13 na pele ventral dos animais do GA em relação a pele da mesma região nos animais do GC, durante a fase de exposição ao sol (P=0,057).

Conforme demonstrado na Figura 4-A, a expressão média de MMP1 na pele de dorso do GA foi de aproximadamente 50 vezes maior em M4 quando comparado ao M2 (P<0.05), e diminuiu a níveis basais no M5 (P<0,05), quando comparado a M4. Na Figura 4-B é possível observar que no ventre do GA, foi observado diferença entre a expressão média de MMP1 no M5 em relação a M1 (P<0,05).

No GC a quantidade média de transcritos de mRNA de MMP1 na pele do dorso foi 13 vezes maior (P<0,05) em M4 quando comparado ao M2 na mesma região, e também diminuiu a níveis basais em M5 (P<0,05) (Figura 4-C). Não houveram diferenças significativas na expressão de MMP1 nas amostras de ventre do GC (Figura 4-D).

A média da expressão gênica da MMP8 no dorso do GA fase de exposição ao sol também foi maior que no período de restrição, todavia, devido

a variância dos dados não foram observadas diferenças significativas (P>0,05), conforme demonstrado na Figura 3-E. Entretanto, na Figura 4-F é possível observar que nas amostras de ventre do mesmo grupo, a expressão aumentou significativamente (P<,0,05) no primeiro dia de exposição ao sol (M3), após um período de 30 dias de restrição (M2). Não houveram diferenças significativas na expressão de MMP8 nas amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental, bem como não houveram diferenças na expressão média da MMP13 em nenhuma das regiões de ambos os grupos.

A expressão gênica da MMP13 na pele do dorso e ventre do GA e GC não diferiu significativamente (P>0,05) ao longo do período experimental.

Houveram diferenças significativas (P<0,05) na expressão da MMP1 entre amostras de pele das regiões dorso e ventre tanto no GA quanto no GC. Foi observado que em M4, no GA, a expressão média de MMP1 na pele do dorso foi 20 vezes maior que a de ventre (Figura 5-A) e no GC a expressão na região de dorso foi sete vezes maior que a de ventre (Figura 5-B). Não foram observadas diferenças significativas na expressão das demais colagenases entre regiões em ambos os grupos (Figura 5-C a F).

Na comparação entre grupos, a expressão de MMP1 na pele de dorso, em M4, foi significativamente (P<0,05) maior no GA do que no GC (Figura 6-A). Não houveram diferenças significativas (P>0,05) entre GA e GC, na expressão desta colagenase na pele de ventre, em nenhum momento estudado (Figura 6-B).

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de MMP8 e MMP13, tanto em dorso quanto ventre, entre GA e GC. Entretanto, quando analisadas as diferenças entre a expressão média de MMP13 na pele de ventre, foi observado uma tendência (P=0,057) a subexpressão no GA em relação ao GC no M4 (Figura 66-F).

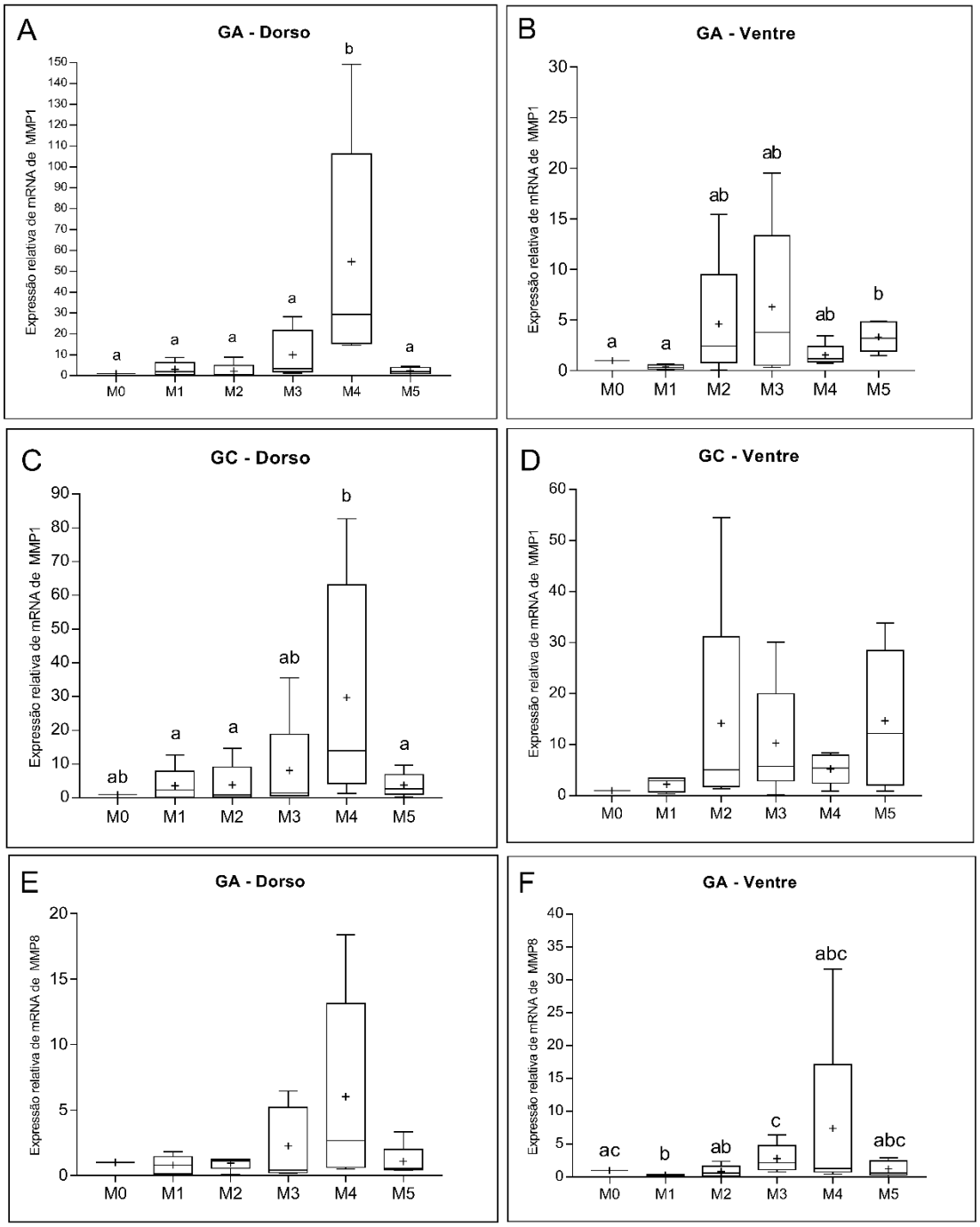


Figura 4. Expressão gênica das colagenases MMP1 e MM8, ao longo do período experimental. Letras acima dos diagramas em A, B e C indicam diferenças estatísticas (P<0,05) da expressão gênica da MMP1 entre os momentos avaliados. Letras acima dos diagramas em F indicam diferenças significativas (P<0,05) da expressão gênica de MMP8 em dorso e ventre do GA, entre os momentos avaliados.

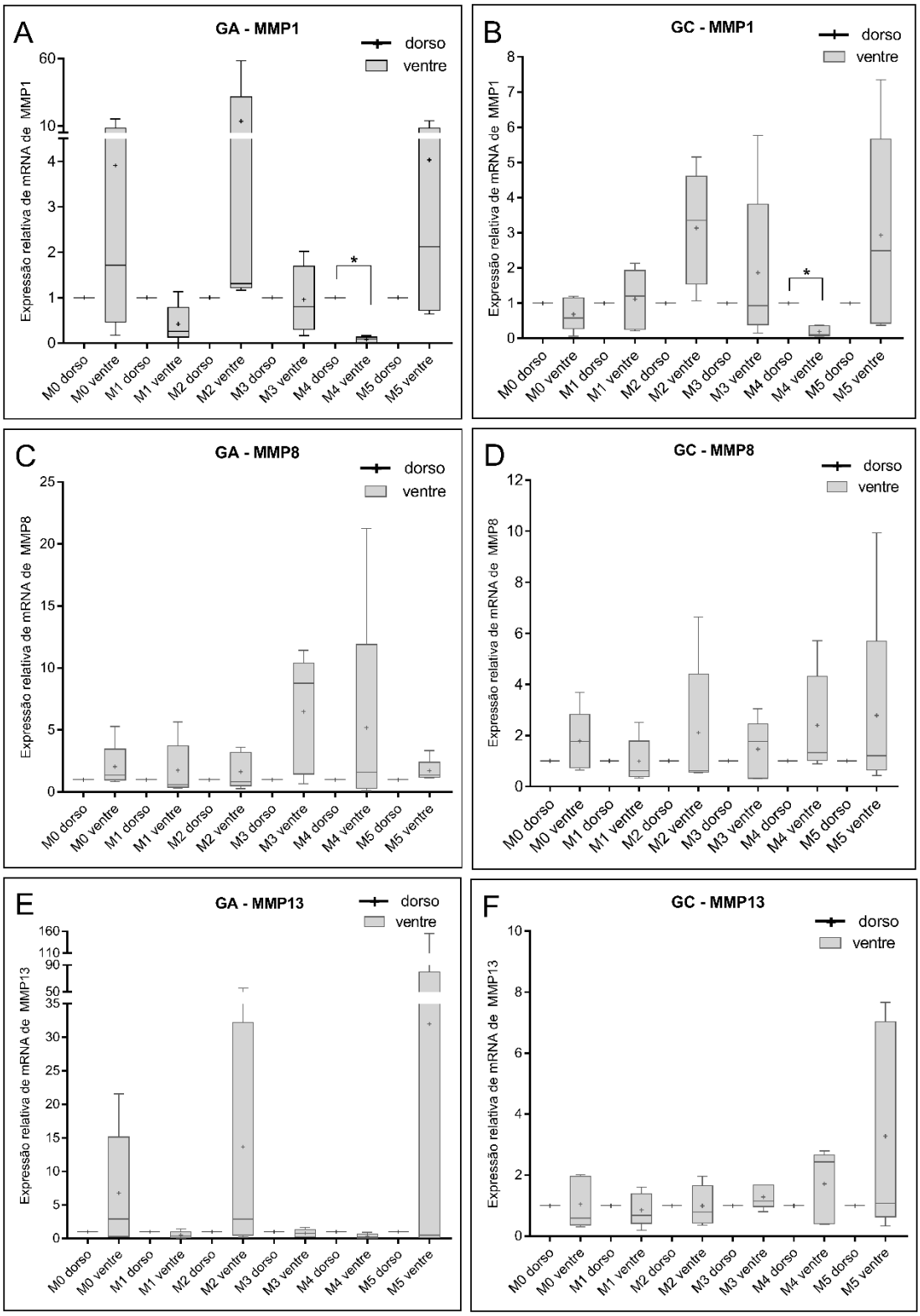


Figura 5. Gráficos demonstrando a expressão gênica das colagenases MMP1 (A e B), MMP8 (C e D) e MMP13 (E e F) entre as regiões de dorso e ventre no GA e GC. Amostras de dorso receberam valor relativo de 1,0 e as amostras de ventre foram calculadas proporcionalmente. Boxplots ligado por barra com asterisco diferem significativamente entre si (P<0,05).

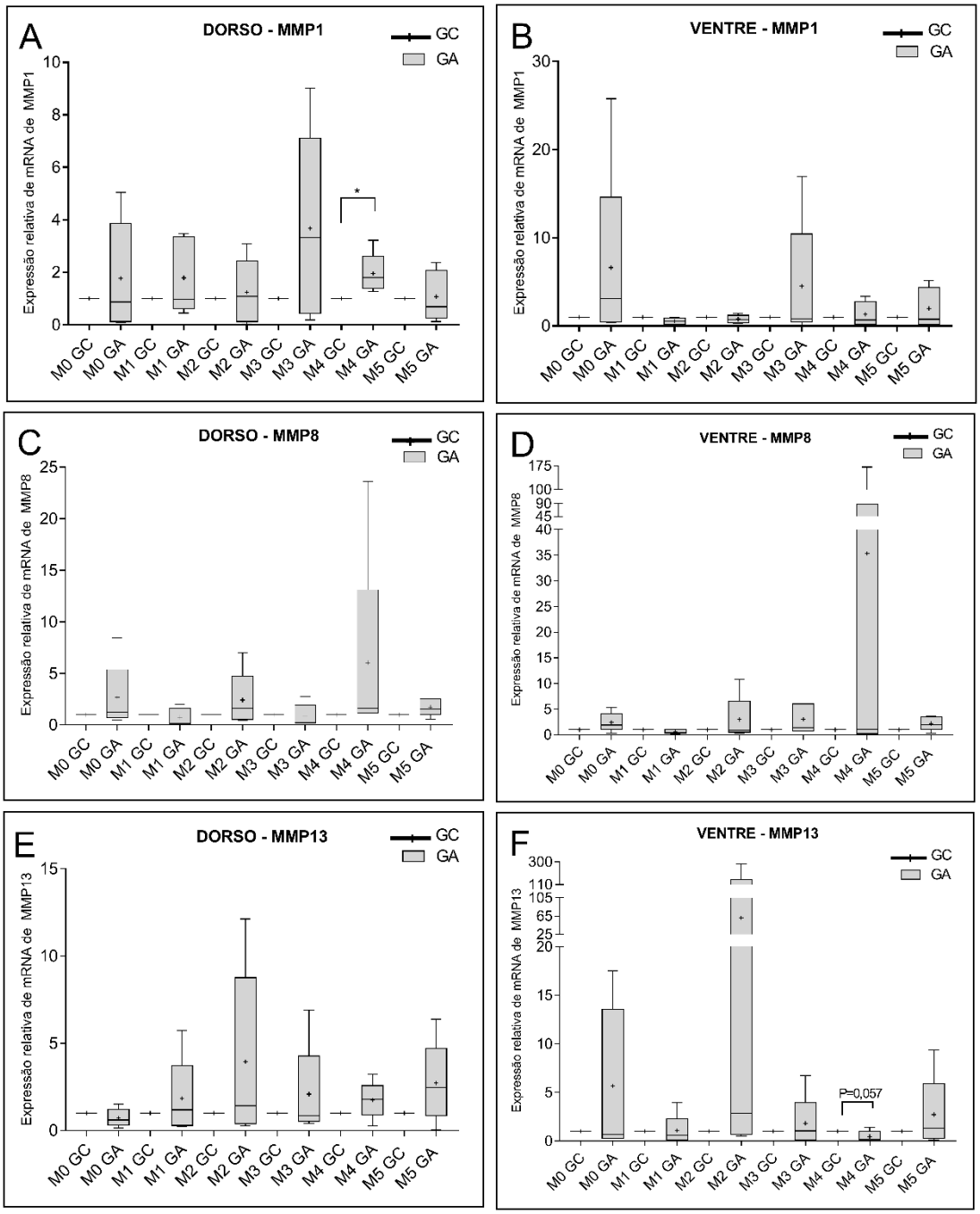


Figura 6. Gráficos demonstrando variação na expressão gênica das colagenases MMP1 (A e B), MMP8 (C e D) e MMP13 (E e F) das amostras de dorso a esquerda e de ventre a direita, comparando as diferenças entre GC e GA. Barra com asterisco ligando diagramas no M4 em A, indicam diferenças significativas (P<0,05) da média de expressão gênica de MMP1 entre amostras de pele dorsal entre os grupos avaliados. Em F, o valor de P acima dos diagramas do M4, indica tendência a diferença estatística entre grupos (P=0,057).

DISCUSSÃO

Não foi encontrado na literatura consultada, até o momento, trabalhos que avaliassem os efeitos da radiação solar natural na pele de equinos. Desde a década de 90, pesquisadores avaliam os efeitos da radiação ultra violeta (UV) artificial na pele de humanos, e já foi caracterizado que quantidades de raios UV equivalentes a uma exposição de 5 a 15 minutos ao sol do meio dia foram suficientes para causar uma MED (Minimal Erythema Doses) e aumentar a expressão gênica de MMP1 em até quatro vezes, além de degradar colágeno tipo I na pele de humanos, 24 horas após a exposição (FISHER et al., 1997). Outros pesquisadores observaram que um MED foi necessário para induzir a expressão de MMP1 na pele de humanos, todavia, foram necessários dois MED para que a expressão desta colagenase chegasse ao pico (LAHMANN et al., 2001). Neste trabalho, observamos que o pico da expressão da MMP1 na pele de equinos ocorreu no terceiro dia de exposição à radiação solar natural, após um periodo de 30 dias de restrição ao sol.

Fisher e colaboradores (2001) avaliando expressão gênica e proteica da colagenases MMP1 e MMP8 na pele de humanos irradiada com dois MED de raios UV, observaram uma maior quantidade relativa de mRNA e proforma proteica de MMP1 e não detectaram interferências na expressão da MMP8. Entretanto, neste trabalho ficou evidenciado que a expressão gênica da MMP8, da mesma forma que a MMP1, também foi influenciada pela radiação solar, o que é interessante, uma vez que esta enzima fica contida em grânulos citoplasmáticos em neutrófilos e esta célula normalmente está presente, predominantemente, em tecidos inflamados (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2007; SCHUBERT-UNKMEIR et al., 2010).

Em outro estudo de expressão proteica e atividade enzimática de MMP1 e MMP13, pesquisadores observaram um aumento de 10 vezes na expressão de MMP1 em cultura de celulas de pele tratada com dois MED de raios UVB e, que pelo menos, 50% da enzima MMP1 estava na forma ativa em cultura de células de pele, 72 horas após exposição (BRENNAN et al., 2003). Estes autores também verificaram que não houve influência da radiação solar na expressão de MMP13, confirmando a maior importância da MMP1 no processo de degradação da matriz extracelular dérmica. Neste estudo, observamos a influência da radiação solar na regulação da expressão de MMP1, corroborando com os

achados de Fisher et al. (1996), Lahmann et al. (2001) e Brennan et al. (2003), pois da mesma forma que a radiação solar simulada interfere na expressão de MMP´s na pele de humanos, a radiação solar natural interfere na expressão de MMP´s na pele de equinos *in vivo*, o que sugere um padrão de degradoma cutâneo semelhante entres estas espécies e que o processo de degradação da matriz extracelular dérmica pode ocorrer em equinos em um processo semelhante ao fotoenvelhecimento cutâneo em humanos, ocasionado pela radiação solar (LAHMANN et al., 2001; BRENNAN et al., 2003).

Brennan e colaboradores (2003) não obsevaram diferença na expressão de MMP13 entre amostras de pele expostas a radiação e amostras controle não expostas o mesmo ocorreu aqui, pois não houveram diferenças significativas ($P>0,05$) na expressão de MMP13 na pele da região dorsal e ventral dos equinos de ambos os grupos, em nenhum dos momentos estudados. Todavia, foi observado uma tendência a subexpressão desta MMP na pele do ventre do GA em comparação ao GC no M4. Seguindo a comparação entre grupos, a MMP1 também diferiu entre GA e GC no M4, sendo mais expressa na pele de dorso do GA em relação ao GC. Embora pesquisadores já tenham evidenciado um padrão de expressão oposto entre MMP1 e MMP13 (URÍA et al., 1998) não podemos afirmar que esse padrão existiu neste trabalho, pois a análise não alcançou o nivel de significância de $P<0,05$. Além disto, na análise seriada, ou seja ao longo do tempo, não observou-se diminuição significativa na expressão de MMP13 no mesmo grupo de amostras em que foi observado aumento da MMP1.

O fato de que a expressão de MMP1 na pele dorsal do GA ter sido maior que no GC ($P<0,05$) no M4 pode ter ocorrido devido a conformação ultraestrutural desorganizada, que torna a pele dos afetados mais fina e menos densa (RASHMIR-RAVEN et al., 2015), e consequentemente, com uma maior área de exposição de fibloblastos dérmicos à radiação solar, influenciando na expressão gênica de colagenases, além de maior área de contato molecular para atuação enzimática.

É interessante que mais estudos sejam realizados, principalmente de expressão proteica e de zimologia, para identificar, tanto o(s) extrato(s) celular(es) que pode(m) sofrer uma mudança em seu metabolismo devido a influência da radiação solar, quanto a atividade enzimática envolvida no processo de degradoma cutâneo em equinos com HERDA.

Segundo Rashmir-Raven (2013) equinos afetados por HERDA devem ser mantidos protegidos do sol para que que ocorra melhora clínica e diminuição da severidade das feridas cutâneas, pois a incidência de radiação solar pode contribuir para piora do quadro clinico devido as lesões serem mais comuns na região dorsal, onde a incidência de radiação e o calor são mais intensos, (BROUNTS; RASHMIR-RAVEN; BLACK, 2001; RASHMIR-RAVEN et al., 2004; WHITE et al., 2004). Concordando com esses autores, ficou evidenciado aqui, que a radiação solar na região dorsal é significativamente maior ($P<0,001$) que a região ventral, todavia a expressão gênica das colagenases, aqui estudadas, durante o período de restrição mantiveram-se em níveis basais, semelhantes ao M0, onde os animais estavam em condições à campo, expostos ao sol, e mesmo tendo aumentado de maneira significativa no período de exposição imediato, voltou a níveis basais aos 15 dias de exposição. Desta forma, um manejo onde os animais afetados ficariam sendo protegidos por longos períodos, e posteriormente expostos outra vez, poderia gerar uma condição de reativação constante da expressão de enzimas que atuam no degradoma cutâneo. Assim, fica indicado que os animais sejam protegidos do sol, pelo menos nos períodos do dia com maior incidência de radiação solar.

CONCLUSÃO

A expressão gênica da MMP1 aumenta com HERDA e normais, com pico de expressão de 72 horas no dorso, e no ventre em até 15 dias de exposição à radiação solar natural, após um periodo de 30 dias de restrição ao sol.

A radiação solar, nas condições aqui avaliadas, não influenciaram as expressões de MMP8 e MMP13, na pele de animais afetados e normais, tal qual a MMP1, demonstrando a importancia desta colagenase no processo de degradoma cutâneo nos animas.

Os animais afetados necessitam de proteção da radiação solar, pelo menos nos periodos de maior incidência diária de radiação solar.

REFERÊNCIAS

BADIAL, P. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; PANTOJA, J. C. F.; MOREIRA, J. C. L.; CONCEIÇÃO, L. G.; BORGES, A. S. Dermatological and morphological findings in quarter horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 547-e96, dez. 2014a. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/vde.12145>.

BADIAL, P. R.; CISNEROS-ÀLVAREZ, L. E.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; TOMAZ, M. A. R. V; MACHADO, V. M.; BORGES, A. S. Ocular dimensions, corneal thickness, and corneal curvature in quarter horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 5, p. 385–392, 2015.

BORGES, A. S.; CONCEIÇÃO, L. G.; ALVES, A. L. G.; FABRIS, V. E.; PESSOA, M. A. Hereditary equine regional dermal asthenia in three related Quarter horses in Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 125–130, 2005.

BOWSER, J. E.; ELDER, S. H.; PASQUALI, M.; GRADY, J. G.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; WILLS, R.; SWIDERSKI, C. E. Tensile properties in collagen-rich tissues of Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA). **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 2, p. 216–222, 2014.

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K. C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 78, n. 1, p. 43–48, 2003.

BRENNEISEN, P.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 973, n. 1, p. 31–43, nov. 2002. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04602.x>.

BROUNTS, S. H.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; BLACK, S. S. Zonal dermal separation: A distinctive histopathological lesion associated with hyperelastosis cutis in a Quarter Horse. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 219–224, 2001.

CAWSTON, T. E.; WILSON, A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 983–1002, 2006.

FISHER, G. J.; DATTA, S. C.; TALWAR, H. S.; WANG, Z.-Q.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v. 379, n. 6563, p. 335–339, 25 jan. 1996. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/379335a0>.

FISHER, G. J.; WANG, Z. Q.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Pathophysiology of premature skin ageing induced by ultraviolet light. **N. Engl. J. Med**. 337, 1419–1428. 1997.

FISHER, G. J.; CHOI, H-C.; BATA-CSORGO, Z.; SHAO, Y.; DATTA, S.; WANG, Z-Q.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Ultraviolet Irradiation Increases Matrix Metalloproteinase-8 Protein in Human Skin In Vivo. **J Invest Dermatol** 117:219-226, 2001.

GRADY, J. G.; ELDER, S. H.; RYAN, P. L.; SWIDERSKI, C. E.; RASHMIR-RAVEN, A. M. Biomechanical and molecular characteristics of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 591–599, 2009.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; INADA, M.; BALBÍN, M.; FUEYO, A.; PITIOT, A. S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S. D.; NOËL, A.; WERB, Z.; KRANE, S. M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PUENTE, X. S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 10, p. 2580–2591, 1 ago. 2007. Disponível em: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.06-7860com>.

ISHIKAWA, Y.; VRANKA, J. A.; BOUDKO, S. P.; POKIDYSHEVA, E.; MIZUNO, K.; ZIENTEK, K.; KEENE, D. R.; RASHMIR-RAVEN, A. M.; NAGATA, K.; WINAND, N. J.; BÄCHINGER, H. P. Mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in american quarter horse does not affect peptidylprolyl cis-trans isomerase activity but shows altered cyclophilin b-protein interactions and affects collagen folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 22253–22265, 2012.

KOIDE, T.; NAGATA, K. Collagen biosynthesis. **Topics in Current Chemistry**, v. 247, p. 85–114, 2005.

LAHMANN, C.; YOUNG, A. R.; WITTERN, K.; BERGEMANN, J. Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 6, p. 657, 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1562/0031-8655(2001)073%3C0657:IOMFMM%3E2.0.CO;2>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MOCHAL, C. A.; MILLER, W. W.; COOLEY, A. J.; LINFORD, R. L.; RYAN, P. L.; RASHMIR-RAVEN, A. M. Ocular findings in Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 3, p. 304–10, 1 ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673112>.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 558–564, out. 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067404001097>.

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 5, p. 1135–1149, 2000.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; WINAND, N J; READ, R. W.; HOPPER, R. M.; RYAN, P. L.; POOLE, M. H.; ERB, H. N. Equine Hyperelastosis Cutis Update. **50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2004, Denver, Colorado,** n. January, p. 1409–1204, 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268337943>.

RASHMIR-RAVEN, A. Heritable Equine Regional Dermal Asthenia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 29, n. 3, p. 689–702, dez. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074907391300059X>.

RASHMIR-RAVEN, A.; LAVAGNINO, M.; SEDLAK, A.; GARDNER, K.; ARNOCZKY, S. Increased susceptibility of skin from HERDA (Hereditary Equine Regional Dermal Asthenia)-affected horses to bacterial collagenase degradation: A potential contributing factor to the clinical signs of HERDA. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 6, 2015.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; SPIER, S. J. Hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA) in Quarter Horses: A review of clinical signs, genetics and research. **Equine Veterinary Education**, v. 27, n. 11, p. 604–611, 2015.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 4, p. 705–720, 2002.

SCHUBERT-UNKMEIR, A.; KONRAD, C.; SLANINA, H.; CZAPEK, F.; HEBLING, S.; FROSCH, M. Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. **PLoS Pathog**., v. 6, n. 4, 2010.

SOLOMONS, B. Equine cutis hyperelastica. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 6, p. 541–542, nov. 1984. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3306.1984.tb02014.x>.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 463–516, nov. 2001. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.

TRYON, R. C.; WHITE, S. D.; FAMULA, T. R.; SCHULTHEISS, P. C.; HAMAR, D. W.; BANNASCH, D. L. Inheritance of hereditary equine regional dermal asthenia in Quarter Horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 437–442, 2005.

TRYON, R. C.; WHITE, S. D.; BANNASCH, D. L. Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse. **Genomics**, v. 90, n. 1, p. 93–102, 2007.

URÍA, J. A.; JIMÉNEZ, M. G. BALBÍN, M.; FREIJE, J. M. P.; LÓPEZ-OTÍN, C. Differential Effects of Transforming Growth Factor-b on the Expression of Collagenase-1 and Collagenase-3 in Human Fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry.** vol. 273, n. 16, pp. 9769–9777, 1998.

WHITE, S. D.; AFFOLTER, V. K.; BANNASCH, D. L.; SCHULTHEISS, P. C.; HAMAR, D. W.; CHAPMAN, P. L.; NAYDAN, D.; SPIER, S. J.; ROSYCHUK, R. A. W.; REES, C.; VENEKLASEN, G. O.; MARTIN, A.; BEVIER, D.; JACKSON, H. A.; BETTENAY, S.; MATOUSEK, J.; CAMPBELL, K. L.; IHRKE, P. J. Hereditary equine regional dermal asthenia (’hyperelastosis cutis’) in 50 horses: Clinical, histological, immunohistological and ultrastructural findings. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 207–217, 2004.

10 ANEXOS

ANEXO 1 - Normas da Revista Veterinary Dermatology.

Author Guidelines

Abstract Author Guidelines

Content of Author Guidelines:

1. General,

2. Ethical Guidelines,

3. Submission of Manuscripts ,

4. Manuscript Types Accepted,

5. Manuscript Format and Structure,

6. After Acceptance.

Relevant Documents: **Copyright Transfer Agreement**

Useful Websites: **Submission Site**, **Articles published in Veterinary Dermatology** , **Digital Photography Guidelines** , **Kudos**

1. GENERAL

Veterinary Dermatology is a bi-monthly, peer-reviewed, international journal which publishes papers on all aspects of the skin of mammals, birds, reptiles, amphibians and fish. Scientific research papers, clinical case reports and reviews covering the following aspects of dermatology will be considered for publication:

- Skin structure (anatomy, histology, ultrastructure)
- Skin function (physiology, biochemistry, pharmacology, immunology, genetics)
- Skin microbiology and parasitology
- Dermatopathology
- Pathogenesis, diagnosis and treatment, including prophylaxis, of skin diseases
- New disease entities

Please carefully read the instructions below for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Veterinary Dermatology. Authors are encouraged to visit the Blackwell Publishing Author Services site (**http://authorservices.wiley.com**) for further general information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Veterinary Dermatology adheres to ethical guidelines given below for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements
Veterinary Dermatology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE criteria authorship should be based on:

1. Substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content and
3. final approval of the version to be published.

All of the authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data (such as recruiting cases in multi-centre drug trials) does not justify authorship and, except in the case of complex large-scale or multi-centre research, the number of authors should usually not exceed six. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements, e.g. statisticians hired to analyse data; this may also include clinicians who recruit cases for multi-centre clinical trials.

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see **www.wiley.com/go/nihmandate**

2.2. Ethical Approvals
When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

The Journal reserves the right to reject any paper where there is reason to believe that animals have been subjected to unnecessary or avoidable pain or distress. Where animals have been used in a study, the relevant research ethical or animal welfare or institutional review authority, under which the work was conducted, must be stated. Furthermore, manuscripts describing prospective studies involving client-owned animals should also include documentation of informed client consent.

2.3 Clinical Trials
Randomised clinical trials (RCTs) and systematic reviews should be reported with due regard for the REFLECT guidelines available at **http://www.reflect-statement.org/statement/** .

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations
Papers reporting protein or DNA sequences will not be accepted without a Genbank accession number. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Conflict of Interest: Authors are required to disclose any possible conflict of interest, this may include financial support including consultancies, speaker's fees; any gift, income, funding or other material benefit, unsolicited or otherwise, from a commercial company or individual, even if it was not restricted to the project described in the submission. If in doubt please ask the editor for guidance about declaring a possible conflict. If the author does not include a conflict of interest statement in the manuscript then the following statement will be included by default: 'No conflicts of interest have been declared'.

Sources of funding: sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged.

The “conflict of interest” and “sources of funding” statements should be included immediately before the abstract section of your manuscript.

2.6 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the reviewers' decision and/or comments on their submitted paper may do so by e-mailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.7 Permissions

If the whole or part(s) of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers. Images that have been sold commercially should not be submitted for publication.

2.8 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. Presentation or publication of part or all of the data in, for instance, congress proceedings, should be clearly declared when the paper is submitted.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign copyright to the European Society of Veterinary Dermatology and the American College of Veterinary Dermatology. Assignment of Copyright is a condition of publication. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed).

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen
If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License .html.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: http://www.wiley.com/go/funderstatement .

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link above to preview the terms and conditions of this license.

For questions concerning copyright, please visit Copyright FAQs .

2.9 Committee on Publication Ethics (COPE)
VDE is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics (COPE) .

C O P E
Member since 2009
JM03632

3. SUBMISSION AND ACCEPTANCE OF MANUSCRIPT

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site http://mc.manuscriptcentral.com/vde .

If assistance is needed (or if, for some reason, online submission is not possible) the Editorial Office can be contacted at VDEedoffice@wiley.com and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Papers are invited in the following categories: Reviews, Scientific Papers, Brief Communications, Case Reports, Letters to the Editor and Book Reviews (by invitation from the journal).

1. **Reviews** are by invitation from the journal or with approval from the Editor in Chief.
2. **Scientific Papers** are experimental or observational, ideally hypothesis-driven prospective studies.

3. **Brief Communications** are brief reports and will be limited to 1500 words (based on the text and not counting the words in the title, abstract and references) and up to four figures or tables or graphs. References should be limited to twelve.

For some articles the editor *may* require that the brief communication is reduced to less than 750 words, two figures and six references; the editor will annotate the abstract to several key points.

4. **Case Reports** (or case series) will be limited to 1500 words (based on the text and not counting the words in the title, abstract and references) and up to four figures. References should be limited to twelve. They will be considered for publication primarily if they add new and useful information for the discipline of veterinary dermatology; consideration will be given to:
a. Reports of new diseases or conditions, or variations on recently described diseases.
b. Reports of diseases that are of zoonotic importance or are highly contagious.
c. Reports that will make a significant change in how a disease is diagnosed or treated.

Supporting information containing additional text and figures may be allowed.

The editors *may* require that a case report is reduced to less than 750 words; two figures and six references; the abstract will be reduced to several key points by the editor.

5. **Letters to the Editor**: will be limited to 750 words, including references, and two (usually one) image / figure / table which may include one clinical image and one of histopathology; letters may cover a variety of topics and these may include but are not restricted to:
a. Briefly highlighting an issue with a previously published paper.
b. Seeking to generate discussion or awareness of a developing area.
6. **Books for review** should be sent to the *Veterinary Dermatology* Editorial Office at:
Veterinary Dermatology, Wiley-Blackwell, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Veterinary Dermatology operates a system of double-blinded review and the names of the authors will not be disclosed to the reviewers. Authors should therefore avoid including anything that could identify them within the text. This, for example, includes: the name of the institution at which the work was performed; initials of the authors; acknowledgements and names of institutions on illustrations, etc. To enable double-blinded review, contributors (including acknowledgements) should only be named on the title page or uploaded separately as a supplementary file, and not on the manuscript. Authors should also avoid statements that could identify them through references (e.g. instead of 'we have previously shown that black is white', authors should write 'previous studies have shown that black is white').

The manuscript (including references and figure legends) must be A4 or 8.5 x 11 inch format with 2.5 cm margins, **single**-spaced typed (please do not submit double line spaced), align text left, 12 point font using sans serif typeface such as Helvetica (Swiss), Arial or Verdana style (please do not use Times New Roman). Each line and page of the manuscript text should be numbered consecutively from the title page.

Authors are requested to write with the minimum of formatting and NOT to write over previous versions, which may contain hidden formatting. Do not enhance text and tables with unnecessary formatting (e.g. small capitals, headers). Software programmes that automatically create endnotes and footnotes should not be used.

Review Articles

In general, review articles are only by invitation and by approval of the Editor in Chief. The structure will vary depending on content. Authors should study the format used in previous issues of the journal for further guidance. Authors wanting to submit a review article should contact the Editor in Chief (via **VDEedoffice@wiley.com**) with a brief description of the article and outline.

Scientific Papers and Brief Communications

Manuscripts should be arranged as follows: title; acknowledgements; abstract; text with subdivisions as given below; references; legends for illustrations.

Case Reports

These are usually a chronological description of the case describing the history, physical findings, differential diagnoses, diagnostic tests, specialist diagnostic procedures, diagnoses, treatments and outcome.

Title Page

The title of the article should be concise but informative. Drug trade names will not be included in the title. The first name, middle initial(s), and last name of each author must be given. Professional affiliations of the authors at the time of the study should be indicated using the symbols *, †, ‡, §, ¶, then **, †† etc., in this order; these are not superscripts. Titles (e.g. professor) and qualifications (e.g. DipACVD) are not required.

Please provide full address details for all of the authors. If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified. The name of the corresponding author, any conflicts of interest and sources of funding (see section 2.5) should be stated. If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated. A short running title of no more than 40 characters (counting letters and spaces) should also be included. The short running title will be used in the journal at the top of the page, see current publications. Keywords are NOT required.

Abstract

The abstract should be no more than 250 words and must be constructed using the subheadings given below. While this format is most appropriate for scientific studies, the authors of reviews, brief communications and case reports are encouraged to also provide a structured abstract using the following:

- Background – A brief explanation of why the study was performed.

- Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.
- Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g. research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g. disease status).
- Methods – A statement of overall study design (e.g. randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.
- Results – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.
- Conclusions and clinical importance – A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

Drug trade names will not usually be included in the abstracts

Introduction

State the purpose of the article. Summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references and do not review the subject extensively.

Materials and Methods

These should be described in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. References for study design and statistical methods should be to standard works (with pages stated) when possible rather than to papers where designs or methods were originally reported. Specify any statistics computer programs used. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial).

The methods of data collection and use of statistical analysis will be checked by the referees, editors and, if necessary, a statistician. It is highly recommended that authors consult a professional statistician for advice on complex statistical analyses. It is also recommended that authors provide details of which statistical methods and the *P*-value, if relevant, have been used for each component of the data set (e.g. $P = 0.08$; ANOVA).

Drugs and therapeutic agents should be given in the format: drug ingredient (trade name; manufacturer name, city, (state), country), e.g. fenbendazole (Panacur; Intervet-Schering Plough, Milton Keynes, UK).

Drug names should follow the recommended International Non-Proprietary Names (rINN). Common examples include cefalexin, ciclosporin, meticillin and rifampicin.

Products such as equipment or methods should be given as: Product name (Company name; town or city, (state) and country); e.g. Datex CD 200-02 (Datex; Hatfield, UK); or SuperScript® III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The detailed information about drugs, therapeutic agents and products need only be given once.

Results

Present your results in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Do not repeat in the text data in the tables or illustrations. In manuscripts describing more than one animal, all animals should be assigned a case number.

Discussion

The discussion should emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Include the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly indicate them as such.

Recommendations , when appropriate, may be included.

Acknowledgements (should be made on the title page or as a separate supplementary file and not included on the manuscript). These are to indicate support, advice or technical help that does not justify authorship. Please use first and second (family) names, e.g. The authors would like to thank Fred Flintstone for assistance with statistical analysis.

Funding sources should be included in the declared sources of funding (see section 2.5).

Language and style

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript thoroughly, and preferably professionally, edited by an English speaking person before submission to make sure that the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found
at **http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp** . All services are paid for and arranged by the author; use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

5.2. Units, Abbreviations and Nomenclature

All units of measurement must follow the SI system. Concentrations of solutions should be given as molar concentrations (e.g. mmol/L). All other concentrations should be expressed as percentages. Drug dosages should be given as: e.g. mg/kg; µg/kg; also use ‘once daily’, ‘twice daily’ etc. Spell out numbers one to nine, keep 10 onwards as numerals. However, use Arabic numerals for numbers used with units of measure (e.g. 9 kg, 5 h, 10 mmol/L). Use h, min, s, for hour, minute, second, respectively. Abbreviations of biological, medical, chemical and other terms should be used only when such abbreviations are both internationally recognized and unambiguous. The first use of an abbreviation must be explained by also giving the unabbreviated term.

All biological, medical, chemical and other names should be given in keeping with the latest international nomenclature. If an animal or micro-organism is being mentioned in the text for the first time, the binomial name should be given, e.g. carp (*Cyprinus carpio*). Thereafter, this can be abbreviated to *C. carpio*. Please check recent articles for information about the spelling of dog and cat breeds.

5.3. Figures (illustrations): Graphs, Tables, Clinical Photographs and Photomicrographs

Figure legends must be given at the end of the manuscript. Sufficient information should be included to allow the figure to be understood without reference to the text. Authors wishing to use any previously published figures

must submit written permission from the copyright holder. Figure legends should be written in the following style:

1. Organ or tissue; animal identification, Case No. A sentence describing the change that is visible in the print. (For photomicrographs add: staining method with names of stains and counter stains and magnification, e.g. avidin–biotin–peroxidase complex method, Mayer's Haematoxylin counter stain, x40).

2. Graph or Table: statement of how data is expressed. Identification of symbols in table, graph, or photo: e.g. N, nucleus.

Examples:
1. Photomicrograph: Intra-epidermal, intact sub-corneal pustule showing small numbers of acantholytic cells and numerous neutrophils. H&E.
2. Table: Comparison of eosinophil counts over time between the control and treatment groups. Error bars indicate the mean ± SD.

5.3.1. Graphs
To ensure high-quality reproduction, symbols should be clear and even throughout and of sufficient size, that when reduced for publication, each item will still be legible. Graph axes should be labelled in sans serif (Helvetica or Arial) font. Letters, Numbers and Titles belong in the legends for illustrations, not on the illustrations themselves.

Software programmes such as GraphPad can be used to download graphs into a word document for submission as an image/figure file.

5.3.2. Tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results and reducing or clarifying the text. Tables may be include within the word file containing the main text, placed after the figure legends; alternatively, large tables should be submitted as separate table files (e.g. in Word or Excel). Number tables consecutively in the order of the first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory material in footnotes, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations such as standard deviation. Ensure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain written permission and acknowledge fully.

5.3.3. Figures; Clinical Photographs & Photomicrographs (histopathology)
Such figures should be ideally be originally captured and submitted in a neutral data format such as TIFF or EPS. There is no requirement to convert an original uncompressed JPEG file to TIFF or EPS format. (JPEG format will be accommodated but must fulfil the format criteria given below and should be uncompressed). PowerPoint, PDFs and Word graphics are usually unsuitable for reproduction.

Figures should have a minimum resolution of 300 dpi; grey tone and line drawings require 600–1200 dpi. Photographic material should be of such quality that high-contrast that reproductions can be made. Poor-quality images may be removed from a manuscript and where critical to the content may lead to rejection of a manuscript.

Graphics created in the CMYK colour palette (print colours) are preferable to those created in RGB (screen colours) to maximize the consistency of print

reproduction. Images supplied in RGB will be converted to CMYK for printing; this may lead to some variations in colour representation. Immunofluorescence images may be submitted in RGB.

When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.

Clinical and histopathology (photomicrograph) figures must be no more than 19 cm in width and must be submitted at a resolution of 300 dpi.

Limit figures to those that reduce or clarify the text. These should be free of extraneous material and, where possible, if portions of the handler such as fingers or hands are to be included, particularly adjacent to lesions, they should be gloved.

Montage (composite plates) figures are allowed and should have no tooling (space bars) to separate the individual images. Each part should be labelled in the top left-hand corner in black, (or if appropriate for clarity in white) in Arial, in lower case, with no brackets, starting with a, b, c, etc.

5.3.3.1 Photomicrographs

The microscope must be set up for Koehler illumination, so that the light is evenly dispersed in the image.

The epidermis should be at the top of the image and horizontal; the background above the epidermis should be bright and white.

Authors are **not** obliged to use length or scale bars, reviewers/editors may recommend their use because it is deemed to be critical to the understanding of photomicrograph; they are required for electron micrograph images. Magnification (scale) bars should be black, approximately 1 cm long and placed in the lower right corner, 5 mm above the lower margin and with the right end 5 mm from the right margin. The overall magnification can be specified as, for example, (x40) where x10 eye lens x x4 lens = x40 overall.

For more information about the preparation of images please see the guidelines as attached **here** . While these guidelines were written some time ago and technology has moved on the general principles are still applicable. Please ensure that individual figures files are no larger than 5 MB. If your file is substantially bigger than this, please contact the Editorial Office: **VDEedoffice@wiley.com**; to discuss file saving and submission options.

5.4. References (Please note that EndNote™ and Refman™ software for the Journal of the American Veterinary Medical Association can be used for Veterinary Dermatology; please adapt to Vancouver style).

Software programs for creating reference lists may be used but they should be set up so that they generate in-text citations and reference lists according to the instructions and examples given below. Authors bear primary responsibility for the accuracy of all references. References must be limited to those that are necessary and must be cited in the text by superscript numbers in order of citation. Journal titles in the Reference section should be abbreviated in accordance with the National Library of Medicine (NLM website) and Index *Medicus*. For references with more than 3 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by ‘ *et al*.’ The following is the style used for common types of references:

Article in journal

1**.** Müntener T, Doherr MG, Guscetti F *et al*. The canine hair cycle – a guide for the assessment of morphological and immunohistochemical criteria. *Vet Dermatol* 2011; 22: 383-395.

Book

2**.** Scott DW. *Large Animal Dermatology*. Philadelphia, PA: Saunders, 1988; 457–458.

Book chapter

3**.** Muir P, Johnson KA, Manley PA. Fractures of the pelvis. In: Birchard SJ, Sherding RG, eds. *Saunders Manual of Small Animal Practice*. 2nd edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2000; 1126–1132.

Proceedings

4**.** Kunkle G, Hillier A, Beale K et al. Steroid effects on intradermal skin testing in sensitized dogs. In: *Proceedings of the American Academy of Veterinary Dermatology & American College of Veterinary Dermatology* . Charleston, SC, USA: 1994; 54–55.

Electronic Material

5**.** Animal and Plant Health Inspection Service website. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). Available at: www.aphis.usda.gov/lpa/issues/bse/bse.html. Accessed Feb 18, 2003.

5.5. Supporting Information

Supporting information, such as data sets, additional figures, tables, video or audio files that will not be published in the print edition of the journal, but will be available via the online edition, may be submitted. Supporting information must be important ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the Journal. Supporting information will be published as submitted, and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality.

Supporting information should be uploaded at the time of manuscript submission using the file designation 'Supporting information'. It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. The content of the Supporting information must not be altered after the paper has been accepted for publication. Authors should note that the publishers will not be held responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) will be directed to the corresponding author of the article.

The availability of Supporting information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed "Supporting information" and providing titles of figures, tables etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the author’s website cannot be reviewed.

5.6. Animal Experiments

Animal experiments are to be undertaken only with the purpose of advancing knowledge and in a manner that avoids unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. They shall be conducted in compliance with federal, state and local laws and regulations, and in accordance with the internationally accepted principles and guidelines for the

care and use of agricultural, laboratory or experimental animals. In the interests of the reproducibility of results, accurate information about any test animals used in the experiments (origin, inbreeding etc.), as well as information about the housing conditions (diet, environment etc.), should be given. For further information and guidance on how to report on animal experiments see: ARRIVE guidelines for reporting animal research see: **ARRIVE guidelines for reporting animal research**

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site; the file should be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within one week of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2 EarlyView

(Publication Prior to Print) *Veterinary Dermatology* is covered by Wiley-Blackwell's EarlyView service. EarlyView articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. EarlyView articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of EarlyView articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so EarlyView articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail

address is provided when submitting the manuscript.
Visit **authorservices.wiley.com/bauthor/default.asp** for more details about online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

6.4 OnlineOpen
Available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers upon publication in *Veterinary Dermatology*, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee (currently $3000) to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository or other free public server. For more information, please visit: **http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html** . Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: **https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp** .

6.5 Author Material Archive Policy
Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hard copy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.6 Offprints and Extra Copies
Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: **offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG** .

If you have queries about offprints please e-mail: **offprint@cosprinters.com**.

6.7 Kudos: New Author Benefit to Increase Readership and Impact
Kudos is a web-based service that helps authors explain, enrich, and share their published work for greater readership and impact. It also provides direct access to a publication dashboard so authors can measure the effect of their actions across a wide range of metrics.

Wiley's partnership with Kudos makes the service free for all Wiley authors. However, those who have registered with **Wiley Author Services** and opted into the mailing list will receive the most streamlined experience. The notification emails sent to those who are registered with Wiley Author Services contain a direct link to claim their article in Kudos. Authors who are unregistered or published prior to 2014 can claim authorship in Kudos by searching for articles by DOI, article title, or author name.

Once authors have claimed their articles, they are led through the following steps:

- Explain articles by adding lay summaries and highlighting what makes the work important.
- Enrich articles by adding links to related resources that put the research into context.
- Share via email and social media, while Kudos links across search engines and subject indexes.
- Access the dashboard area to view usage, citations, and altmetrics for the publications.

What are the benefits for authors?

- Discoverability and Impact – Increases the likelihood of their articles being found, read, and cited.
- Publication Metrics – Provides direct access to usage, citations, and altmetrics for their articles.
- Networking – Encourages interactions that build relationships and visibility within their communities.

Please also see this **introductory video** and **blog post** on Wiley Exchanges for more information.