

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE
NA ESPÉCIE CANINA**

Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro

Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE
NA ESPÉCIE CANINA**

Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

2016

C355o Castro, Raquel Vasconcelos Guimarães de
Obtenção e caracterização de populações de células-tronco
CD200 e CD34 positivas da pele na espécie canina/ Raquel
Vasconcelos Guimarães de Castro. -- Jaboticabal, 2016
vi, 45p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Banca examinadora: Áureo Evangelista Santana, Camila de Paula
Freitas Dell'Aqua
Bibliografia

1. Cão-*bulge*. 2. Citometria de Fluxo. 3. Folículo piloso. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.7:602.9:591.81

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE NA ESPÉCIE CANINA


AUTORA: RAQUEL VASCONCELOS GUIMARÃES DE CASTRO


ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADORA: FABIANA FERNANDES BRESSAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CAMILA DE PAULA FREITAS DELL'AQUA
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária / FMVZ / UNESP - Botucatu/SP

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RAQUEL VASCONCELOS GUIMARÃES DE CASTRO – nascida no município de Barretos, SP, aos 3 dias do mês de setembro de 1988. Concluiu o curso colegial no “Colégio São Carlos”, na cidade de São Carlos, em dezembro de 2005. Ingressou em março de 2007 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no município de Jaboticabal, SP; foi bolsista junto ao Projeto de Extensão Universitária “Montagem de esqueletos de animais domésticos e silvestres para estudo comparativo”. Concluiu, em dezembro de 2011, o curso superior em Medicina Veterinária. Trabalhou na empresa Bio-Biotecnologia Animal de março de 2012 a outubro de 2013. Em março de 2014 ingressou no mestrado pelo Programa de Medicina Veterinária da FCAV – UNESP de Jaboticabal, Área de Concentração Reprodução Animal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Luiz e Ieda por terem semeado em mim o gosto pelo conhecimento e pelo saber. Obrigada por serem meu exemplo, por todo o amor e confiança que me depositaram, por sempre me incentivarem, apesar de qualquer circunstância adversa, e por sempre estarem por perto para me ajudar a seguir meu caminho. Sem tudo isso este mestrado não teria sido possível. Amo vocês profundamente.

Agradeço aos meus irmãos, Rodrigo e Guilherme pela imensa amizade, por todo o carinho, por todo o apoio, as conversas e as trocas de experiência. Vocês são muito importantes na minha formação como pessoa. Agradeço imensamente pela força do laço que nos une. Agradeço também à minha cunhada, Fran, e a minha sobrinha Marina, por me ajudarem a sentir o momento presente. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Joaquim, por ter me aceitado como sua orientada e ter me amparado nessa jornada. Obrigada por todos os ensinamentos, toda a paciência e por ter me ajudado a encontrar as soluções que me faltavam, e por ter sido a luz em minha iniciação na pesquisa.

Agradeço a minha coorientadora, Dra. Fabiana, pelos ensinamentos, correções, idéias, e por nortear meu caminho quando eu fiquei sem direção. Certamente suas contribuições para este trabalho foram inúmeras, e fico muito feliz que tenha entrado em meu caminho.

Agradeço a Mariana, companheira de laboratório e nas nossas viagens. Obrigada por dividir comigo as angústias e preocupações, mas também muitas risadas, brincadeiras, conversas e experiência. Juntas tivemos um grande aprendizado durante estes dois anos.

Agradeço a Amanda Trindade, por sempre tirar minhas dúvidas com protocolos, questões a respeito das células-tronco e métodos a serem desenvolvidos neste trabalho.

Agradeço ao professor Áureo Evangelista Santana, por conceder o uso do Citômetro de Fluxo do laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, situado na FCAV – UNESP, Jaboticabal, e além disso, pelo incentivo a vir fazer este mestrado, em nossa conversa em uma visita

minha à instituição. Obrigada por ser sempre tão solícito e pronto a me ajudar quando necessário.

Agradeço também ao Nathan Cruz pelo auxílio na operação do citômetro de fluxo, e pela imensa paciência em me explicar quantas vezes foi preciso cada aspecto dos gráficos gerados e dos resultados fornecidos pelo aparelho. Obrigada pelo tempo que dispendeu me ajudando, mesmo estando bastante ocupado com sua própria defesa e várias outras atividades.

Agradeço aos professores Carlos Eduardo Ambrósio e Daniele dos Santos Martins, por permitirem a utilização do Laboratório de Imuno-histoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE), situado na FZEA – USP, Pirassununga, bem como pelo material emprestado para a realização dos testes de imuno.

Agradeço também à Naira Pieri, pós doutoranda da USP, Pirassununga, por me ensinar e ajudar com os protocolos e feitiço dos testes de imunofluorescência e imunocitoquímica, e por ter sido tão atenciosa em me ajudar a escolher os melhores anticorpos à serem comprados.

Agradeço a Tais Sasahara pela ajuda na repetição dos testes de imunofluorescência, por toda a paciência, pelas dicas, pelo material concedido, pelas conversas e pelo grande empenho em me ajudar. Agradeço também à professora Márcia Rita Machado por nos conceder o uso de seu laboratório e aparelhos.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV-UNESP. Muito obrigada Edson, pelos cafezinhos, conversas e brincadeiras. Obrigada á Roberta por sempre ajudar no preparo dos meios utilizados na rotina do laboratório e manter tudo tão organizado para nós. Obrigada ao Ivo pelo auxílio técnico quando necessário, e a Bel, por auxílios na secretaria.

Obrigada também a todos os pós-graduandos do departamento que dividiram suas experiências, seus relatos e informações. Esse convívio foi muito importante para o meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço às minhas grandes amigas, Paloma, Lívia, Karina e Bia por terem estado ao meu lado durante todas as dificuldades. Vocês tornaram tudo mais leve, mais descontraído. Obrigada por todas as risadas, brincadeiras, conversas, cafés,

lanchinhos da tarde. A amizade de vocês foi muito importante nessa fase da minha vida, e sei que posso contar com vocês sempre.

Agradeço à Manu, menininha querida, que apesar da distância está sempre presente na minha vida. Conversar com você sempre me acalma. Nossa amizade é muito importante para mim, e saber que você existe me faz feliz.

Obrigada a todos os amigos da "Vet MPB" que mesmo longe são muitíssimo importantes para mim. Obrigada por cada mensagem recebida, desabafo, conversa e brincadeira. Obrigada também ao nosso anjinho, Fer, que agora está no céu. Lembro muito bem do caderninho que me enviou para eu estudar quando disse que queria prestar o mestrado. Seu jeitinho doce, e a pessoa especial, iluminada e maravilhosa que você era ficaram em minha memória como uma linda recordação sua. Obrigada por ter estado presente desde a nossa graduação e, também, nesse primeiro passo, da longa caminhada que foi o mestrado. Quem tem amigos tem tudo!! Amo todos vocês.

SUMÁRIO

Sumário.....	i
Certificado do Comitê de ética.....	ii
RESUMO.....	iii
Palavras-chave.....	iii
ABSTRACT.....	iv
Keywords.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Revisão de literatura.....	3
Introdução.....	3
Pele e Anexos.....	6
Células-tronco da pele.....	9
Conclusão.....	17
Referências.....	18
CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE NA ESPÉCIE CANINA.....	26
Conteúdo.....	26
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Material e métodos.....	30
Resultados.....	34
Discussão.....	38
Conclusão.....	41
Agradecimentos.....	41
Referências.....	41
Anexo 1 – Termo de compromisso proprietário.....	45



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011904/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Isolamento, caracterização e indução de pluripotência em células mesenquimais de pele de cão"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de agosto de 2014.

Jaboticabal, 12 de agosto de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE NA ESPÉCIE CANINA

RESUMO - A pele é um órgão extenso e de fácil acesso, e possui vários tipos celulares diferentes que estão em constante renovação. Dentre estas células, alguns tipos de células-tronco com potencial proliferativo, de autorrenovação e de diferenciação, são responsáveis pela manutenção da homeostase deste órgão e pela cura de feridas. Estudos anteriores sugerem a existência de um nicho de células-tronco presente no “bulge” dos folículos pilosos, que contém populações positivas para CD200 e CD34. Este trabalho foi realizado com o intuito de: 1- Obter tecidos derivados da pele de cães adultos e fetos, isolar e cultivar as células *in vitro* derivadas destes, empregando um método de isolamento celular através de digestão enzimática simples 2- Comprovar a presença de células do “bulge”, positivas para CD200 e CD34 após cultivo celular *in vitro*, comparando com a análise do tecido; Uma coloração por hematoxilina e eosina foi realizada da pele de cães adultos e fetos, e biopsias e células cultivadas *in vitro* foram caracterizadas pela presença das proteínas CD200 e CD34 através de imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo. Os resultados da imunofluorescência foram negativos para ambos CD200 e CD34 nas peles de feto e adulto. Na imunocitoquímica, as células foram positivas para CD34 e CD200, tanto em fetos quanto adultos. Adicionalmente, o marcador de pluripotência OCT4 foi testado, sendo expresso em células de feto. Por citometria de fluxo, a porcentagem média de células marcadas duplamente por CD200 e CD34 nos adultos foi de 3,1% e nos fetos de 0,33% (n=3). A marcação somente por CD200 foi encontrada somente nos adultos, sendo de 2,8% (n=3). Os resultados sugerem ser possível a obtenção de células-tronco do “bulge” do folículo piloso através do método de digestão enzimática simples, utilizado neste trabalho. Este estudo é o primeiro passo para novas pesquisas que envolvam esse nicho, na pele de cães.

PALAVRAS-CHAVE – bulge, citometria de fluxo, cultivo celular, folículo piloso, imunofluorescência

OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF STEM CELL POPULATIONS POSITIVE FOR CD200 AND CD34 FROM CANINE SKIN

ABSTRACT – Skin is an extensive and easily accessible organ, possessing various cell types which are in constant renovation. Some stem cell types found in the skin have the potential of self-renewal, proliferation and differentiation, processes which are responsible for the organ's maintenance of homeostasis and the healing of wounds. Previous studies suggested the presence of a stem cell niche at the bulge region of the hair follicle, which contains cell populations positive for CD200 and CD34. Thus, this work sought to identify these cell populations in canine cultures using the following methods: 1. 1- Collecting samples of adult and fetus canine skin, isolating and culturing these cells in vitro using a method of simple enzymatic digestion; 2- Testing the cell cultures for CD200 and CD34 in vitro, comparing them with analyzed tissue material. Hematoxylin and eosin staining were conducted for the biopsies and analysis of fetal and adult canine skin, with the extracted cell cultures being characterized for the presence of the proteins CD200 and CD34 through immunofluorescence, immunocytochemistry and flow cytometry. In both adult and fetal tissue samples, CD200 and CD34 immunofluorescence results were negative. In immunocytochemistry, both fetal and adult cultures cells tested positive for CD34 and CD200. The pluripotency marker OCT4 was also tested, and was positive for fetal culture cells. Flow cytometer results showed that, for samples with a double staining of CD200 and CD34 the average percentage of marked cells was 3.1% in adults and 0.33% in fetal cells (n=3). For the CD200 marker alone, positive cells were found only in adult cultures, representing 2.8% of the total population (n=3). In conclusion, the results suggest that obtaining bulge stem cells from both fetuses and adults, with use of CD200 and CD34 markers, is validated through the simple enzymatic digestion and cell culture methods utilized in this study. The present work is the first step towards developing new research involving this niche in dogs.

Keywords – bulge, flow cytometry, cell culture, hair follicle, immunofluorescence

Lista de Figuras

- Figura 1.** Aspecto das colônias formadas em cultivo de células da pele de adultos (A, B e C) e de fetos (D e E). A- Pele adulto 5° dia de cultivo B- Pele adulto 8° dia de cultivo, presença de pelo C- Pele adulto 8° dia de cultivo, nota-se células de duas morfologias diferentes D- Primeiro dia do cultivo em feto de aproximadamente 45 dias de idade E- Nono dia de cultivo em feto de aproximadamente 58 dias, formação de colônias de duas morfologias diferentes.....35
- Figura 2.** Coloração por hematoxilina e eosina. FP = folículos pilosos, setas = glândula sebácea. A – Cortes transversais em pele de adulto B – Cortes oblíquos em pele de adulto C- Pele de feto de aproximadamente 45 dias.....35
- Figura 3.** Secções histológicas nos quais foram realizados os testes de imunofluorescência. Em azul verificamos os núcleos, marcados com DAPI. O resultado foi negativo tanto para CD200 quanto para CD34. O pêlo apresenta autofluorescência vermelha, sendo necessário desconsidera-la. A- Adulto e B- Feto.....37
- Figura 4.** Imunocitoquímica. Presença de marcação por CD34 em cultivo de pele de adulto (A) e feto (B). Marcação positiva para CD200 em cultivo de pele de adulto (C) e feto (D) E- Marcação positiva para OCT4 em cultivo de pele de feto.....37
- Figura 5.** Citometria de fluxo: “Dot plot” da dupla marcação para CD200 (Alexa Fluor 680, visualizado no canal APC-A) e CD34 (Alexa Fluor 488, visualizado no canal do FITC-A) nos experimentos relativos a fetos (três primeiros 1F, 2F e 4F) e relativas a adultos (três últimos 5A, 6^a e 7A).....38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos utilizados na imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo.....32

Tabela 2. Resultados porcentagens de células CD200 + CD34 e somente CD200 positivas na citometria de fluxo.....36

Capítulo 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão de grande importância para a manutenção de funções essenciais aos indivíduos. Ela evita a perda de água e eletrólitos, participa na termorregulação, é um órgão sensorial e serve de barreira a patógenos. Além de sua renovação contínua natural, ela está frequentemente envolvida em injúrias, como traumas e queimaduras, e por isso as células de sua camada proliferativa (a camada basal) estão em contínua divisão. Por ser um órgão extenso e de fácil acesso, a pele é alvo constante de pesquisas com células-tronco.

Em média 20 tipos celulares diferentes estão presentes na pele, que é composta pela epiderme, derme e hipoderme. Várias estruturas auxiliares, como folículos pilosos, glândula sebácea e músculo eretor do pelo, por exemplo, estão inseridos nessas camadas, e cada estrutura dessas possui uma variedade de células. Assim, com tantos tipos celulares diferentes, a caracterização da fração obtida de um isolado de pele é importante para o conhecimento de quais as populações presentes nesse órgão e, conseqüentemente, suas possíveis utilizações.

Estudos comprovam a existência de um nicho de células-tronco na pele, na região da protuberância do pelo, ou “bulge”, que já foi demonstrada em camundongos, humanos e cães, (COTSARELIS et al., 1990; LYLE et al., 1998; PASCUCCI et al., 2006). As células contidas no “bulge” são capazes de dar origem a epiderme e às células do folículo piloso sendo, portanto, essa região responsável por prover células não só para o crescimento de novos pelos, mas também para a regeneração da pele (TAYLOR et al., 2000).

No presente trabalho, a presença de células-tronco derivadas do “bulge” do folículo piloso da pele de cães foi analisada nos tecidos e em cultivos celulares, fetais e adultos, através da detecção das proteínas de membrana CD34 e CD200 em ensaios de imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo.

A proteína CD200 foi escolhida, pois sua expressão na pele é restrita às células do “bulge” do folículo piloso (OHYAMA et al., 2006), região conhecida por ser o nicho de células-tronco responsável pela regeneração do pelo, da epiderme e das glândulas sebáceas (TAYLOR et al., 2000; OSHIMA, 2001). O CD34, apesar de expresso em outros tipos celulares, também é expresso nesse nicho, na espécie canina (PASCUCCI et al., 2006).

Amostras de pele de indivíduos adultos e em fase fetal foram coletadas, para comparação entre elas. Essa comparação é importante, pois existem diferenças quanto à capacidade de proliferação das células mais jovens em relação às células que já sofreram maior número de mitoses ao longo da vida do indivíduo. As células fetais, por exemplo, possuem poucas das mutações acumuladas durante a vida, quando comparadas às células de um indivíduo adulto, e por isso podem oferecer maior potencial proliferativo e plasticidade do que as células-tronco dos adultos (TAN et al., 2014).

O foco deste estudo é a espécie canina. Porém, além do interesse no desenvolvimento de estudos com células-tronco para uso nesta espécie, existem várias razões para usar o cão como modelo experimental para doenças humanas. Alguns exemplos disso incluem maiores similaridades na fisiologia, apresentação de doenças e respostas clínicas entre os seres humanos e os cães, comparadas a vários outros modelos tradicionais usados em pesquisa (SCHNEIDER et al., 2010).

Além disso, casos de traumas levando a grande perda de continuidade do tegumento, como atropelamentos, mordeduras e queimaduras, por exemplo, são um grande desafio enfrentado por cirurgiões veterinários e muitas vezes exigem o emprego de um substituto que mimetize as características da pele. O ideal é que este substituto proporcione a cura efetiva da injúria, tenha similaridade fisiológica e qualidades mecânicas semelhantes às da pele, e baixas toxicidade e rejeição imune (BOYCE et al., 2001). Além do reestabelecimento da arquitetura normal do tecido, o substituto deve reinstaurar a pigmentação normal da pele, os nervos e vasos sanguíneos anexos, além de funcionar efetivamente como uma barreira na proteção contra patógenos (KAMEL et al., 2013).

Um substituto interessante seria um enxerto da pele do próprio paciente. Assim, técnicas empregando a retirada de um fragmento de pele, isolamento de

suas células seguido de cultivo em laboratório para aumento do número de células disponíveis e posterior aplicação são desejáveis e, portanto, o tema deve ser alvo de muitas pesquisas. Uma malha de queratinócitos, retirados do próprio paciente, e cultivados em laboratório até que um volume considerável de células fosse atingido já foi utilizada com sucesso para restaurar lesões de pele (GREEN et al., 2008), e é um bom exemplo da importância do cultivo celular *in vitro* para a obtenção de células em situações onde o organismo não consegue sozinho a regeneração adequada de um órgão. Neste aspecto, as células-tronco são muito promissoras por serem capazes de se diferenciarem em vários tipos celulares e, portanto, possuem um grande potencial regenerativo.

Assim, o estudo sobre o isolamento de células de uma fonte acessível como a pele e a caracterização dessas células é de grande importância para futuras aplicações clínicas não só de injúrias no próprio tegumento, mas também em lesões que envolvam outros tecidos de origem mesenquimal e, possivelmente, até mesmo ectodermal.

O objetivo do presente trabalho é a caracterização das células derivadas da pele canina quanto à presença e localização de células-tronco do “bulge” do folículo piloso. Como objetivos específicos buscam-se: 1) Isolar e cultivar células derivadas da pele de cães adultos e fetos empregando um método de digestão enzimática simples; 2) Caracterizar a presença de células-tronco positivas para os marcadores CD200 e CD34 em cultivos *in vitro*; 3) Comparar as marcações encontradas nos cultivos de células às dos tecidos criopreservados. Com isso busca-se obter populações com características mais acentuadas de células-tronco, como autorrenovação, proliferação e capacidade de diferenciação e, portanto com melhor desempenho nas terapias regenerativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Introdução

A pele é a interface do indivíduo com o ambiente que o circunda. Ela exerce várias funções como retenção dos fluídos corpóreos, prevenindo a desidratação, e

mantém potenciais patógenos fora do organismo. Essa função de barreira imunológica é de suma importância e deve ser rigorosamente mantida, sendo traumas, como feridas e queimaduras, problemas de grande importância para a saúde de um indivíduo. Casos onde os traumas são muito extensos são desafios encontrados na rotina médica e veterinária, levando a busca constante por tratamentos alternativos. Atualmente, tratamentos que tem como base a utilização de células-tronco têm sido muito estudados.

As terapias baseadas em células-tronco terão um grande impacto na medicina do futuro. Essas células são indiferenciadas e podem produzir uma progênie de mais células-tronco (propriedade de autorrenovação), ou se dividirem assimetricamente em dois tipos celulares, sendo em uma nova célula-tronco (mantendo assim sua indiferenciação) ou em uma célula chamada “transit amplifying cell”, que perdeu sua capacidade de autorrenovação ilimitada e já iniciou seu caminho de diferenciação em outro tipo celular (SELLHEYER e KRAHL, 2010).

A plasticidade das células mesenquimais é uma das características que torna possível o desenvolvimento de terapias celulares. A aplicação das células-tronco pode ser realizada com o intuito de instigar a reconstrução tecidual, ou proteger as células parcialmente afetadas e prevenir sua completa destruição. Tais abordagens, usando vários tipos de células-tronco são o impulso da pesquisa na medicina regenerativa, sendo a terapia de substituição celular um adjuvante contra a progressão das doenças, por exemplo, na degeneração do sistema nervoso central (KARUSSIS et al., 2013). Além do potencial terapêutico as células-tronco são ferramentas valiosas para manipulação gênica, clonagem, a produção de quimeras e de animais transgênicos.

A epiderme é um modelo interessante para o estudo de células-tronco, dada a importância de sua manutenção ao longo da vida e a natureza dinâmica de sua homeostase (FORDHAM e JENSEN, 2012). Os folículos pilosos possuem um ciclo de crescimento e regeneração ao longo da vida do animal, o que sugere a presença de células-tronco específicas nesse tecido (COTSARELIS, 1990; FUCHS et al., 2001).

Segundo Pastuchenko et al. (2015) existem compartimentos na pele onde essas células estão presentes, como o istmo, o infundíbulo, a epiderme interfolicular

e o “bulge”. Na homeostase, processo no qual o número de células com capacidade de regeneração de determinado órgão se mantém constante, as células-tronco de cada compartimento são responsáveis por repor as células diferenciadas que morrem. Na prática, além do importante papel na homeostase, as células-tronco podem também ser utilizadas em tratamentos de queimaduras e feridas extensas na pele.

Além da importância do estudo dessas células no cão, para uso veterinário, outra possibilidade interessante relacionada a esta espécie é o fato de ela servir como modelo de estudos para a espécie humana. Segundo Ostrander e Kruglyak (2000) a fisiologia, a apresentação das doenças e as respostas clínicas dos cães frequentemente mimetizam as doenças humanas. Eles revisaram o tema e ressaltam casos em que estudos em genética canina são mais apropriados para solucionar os problemas encontrados na genética humana do que os estudos realizados em camundongos, por exemplo.

Segundo Cibelli et al. (2013) o modelo camundongo não reproduz fielmente algumas condições de doenças humanas e, além disso, esses animais são muito pequenos, tem vidas curtas e fisiologia substancialmente diferente da dos humanos. Por sua vez, os animais maiores como coelho, cão, porco, cabra, ovelha e primatas não humanos são frequentemente modelos melhores. Eles possuem uma vida mais longa, o que possibilita o acompanhamento em longo prazo quando há aplicação de células-tronco, seu sistema imune e outros parâmetros fisiológicos são mais semelhantes aos dos humanos e, além disso, existem vantagens com relação a quantidade e tipo de células para a terapia, cujo método de extração de um único animal tem reprodutibilidade e rende quantidade suficiente para manipulação das análises e para várias aplicações (HARDING et al., 2013) Sendo assim, os resultados dos modelos utilizando grandes animais, como cão ou suíno, são mais preditivos para estudos de terapia gênica de células-tronco de humanos do que os resultados em camundongos, por exemplo (HORN et al., 2004).

Dada a importância do tema, nesta revisão serão discutidos aspectos anatômicos, histológicos e da embriologia da pele de cães, bem como a existência e importância de células-tronco neste órgão e os marcadores utilizados para algumas das diferentes populações de células-tronco adultas encontradas nele.

2.2 Pele e anexos

A pele e seus anexos garantem várias funções necessárias para a sobrevivência animal. Ela protege da perda de água, mudanças na temperatura, radiação, traumas e infecções além de permitir que o animal perceba o ambiente que o envolve através de sensores tácticos (KOBIELAK et al., 2014). Nos animais adultos ela é um órgão extenso e complexo com diversos arranjos de células organizadas, originárias de diferentes camadas embrionárias, sendo duas suas camadas principais: epiderme (originada da ectoderme) e derme subjacente (originada da mesoderme) (BLANPAIN; FUCHS, 2006).

A epiderme, e seus apêndices, são compostos amplamente por células epiteliais especializadas, os queratinócitos. Esta camada origina também os anexos da pele: folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (BLANPAIN; FUCHS, 2006; HARGIS, 1998). Outros três tipos de células compõe a epiderme, sendo eles melanócitos, derivados da crista neural, células de Langerhans, derivadas da medula óssea e as células de Merkel, com origem na própria epiderme (KOBIELAK et al., 2014; SOUZA et al., 2009). No cão a epiderme consiste em uma a três camadas de células vivas, somente, sendo o tempo de “turnover” médio desse tecido de aproximadamente 22 dias (AFFOLTER; MOORE, 1994; KOBIELAK et al., 2014).

As células derivadas da mesoderme originam na derme os fibroblastos secretores de colágeno, a vascularização que supre os nutrientes para a pele, o músculo eretor do pelo, que se liga aos folículos pilosos, as células de gordura subcutâneas e as células imunes que se infiltram e permanecem na pele (BLANPAIN; FUCHS, 2006). Além destas, uma terceira camada, denominada hipoderme, localiza-se abaixo da derme unindo-a a músculos ou ossos subjacentes. Essa camada é formada por tecido adiposo e fibras colágenas e elásticas (HARGIS, 1998).

Nos animais domésticos a pele é composta por regiões hirsutas ou glabras (HARGIS, 1998), sendo a maior parte da superfície do corpo desses animais coberta por pelagem de densidade variável, que exhibe características relacionadas à espécie e raça. Essa pelagem encontra-se frequentemente envolvida nas desordens

cutâneas e age como um espelho importante para sinalizar doenças (AFFOLTER ; MOORE, 1994). Cada unidade de epitélio contém um folículo piloso e a epiderme que o envolve. Cães e gatos possuem folículos pilosos compostos, formados por vários folículos primários e secundários. Os primários são caracterizados pela presença de um único pelo, emergindo em poros separados, e possuem glândula sebácea, glândula sudorípara e músculo eretor do pelo em anexo. Já os folículos capilares secundários emergem em poros comuns e neles as glândulas sudoríparas e o músculo eretor do pelo são ausentes (AFFOLTER; MOORE, 1994; SOUZA et al., 2009).

A origem da pele nos mamíferos se dá logo após a gastrulação, quando as células da neuroectoderme que permanecem na superfície do embrião tornam-se epiderme, o que se inicia com uma única camada de células progenitoras inespecíficas (BLANPAIN; FUCHS, 2006). A epiderme é formada a partir da proliferação dessa camada de células epiteliais cúbicas, dando origem aos germes epiteliais primários ou germes do pelo. A invaginação desses germes para a derme subjacente, na forma de cordão celular resulta nos folículos pilosos e glândulas anexas da pele (BANKS, 1992). Logo abaixo do aglomerado inicial de células basais, os fibroblastos dérmicos formam um pequeno nódulo, a papila dérmica que, com o desenvolvimento do folículo piloso, se projeta para o centro da área de brotamento e logo é circundada por células epiteliais, que vão formar a base do folículo piloso (SOUZA et al., 2009).

O desenvolvimento da derme ocorre a partir da proliferação de células mesenquimais primitivas, que sofrem um processo de maturação, no qual ocorre, principalmente, o aumento da espessura e do número de fibras colágenas, a substituição gradual do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, a redução da substância fundamental e a diferenciação de células mesenquimais precursoras em fibroblastos (SOUZA et al., 2009). Depois de formada, a derme é composta por fibras colágenas e elásticas imersas numa matriz de sustentação constituída por glicosaminoglicanos e fornece sustentação aos folículos pilosos, glândulas, vasos e nervos. A camada superficial da derme é composta por fibras colágenas delgadas e a camada profunda por feixes mais grosseiros (HARGIS, 1998).

A epiderme hirsuta consiste em quatro camadas enquanto a pele glabra apresenta cinco camadas. A camada mais externa consiste o estrato córneo, formado por várias células queratinizadas achatadas, sendo sua espessura inversamente proporcional à densidade da pelagem. Áreas com pelos esparsos como o escroto e áreas da axila e inguinal em cães e gatos, exibem epiderme um pouco mais grossa e estrato córneo mais proeminente, além de algumas formações de rete ridges (AFFOLTER; MOORE, 1994). A segunda camada, o estrato lúcido, é ausente na pele hirsuta, consistindo em camada delgada de células compactas completamente queratinizadas que recobre o estrato granuloso. Por sua vez o estrato granuloso é composto por células velhas preenchidas por grânulos de querato-hialina. Sob todas essas camadas encontra-se o estrato espinhoso, zona de células poliédricas unidas por desmossomos. A camada mais interna da epiderme é a camada germinativa, ou estrato basal, e é formada por uma única camada de células cúbicas ou cilíndricas (HARGIS, 1998).

Nos seres humanos a derme é dividida em duas camadas sem delimitação, sendo a superior conhecida como derme papilar, que se encontra superficialmente sob a epiderme, e uma camada mais profunda, chamada derme reticular. A derme papilar é primariamente composta de fibroblastos dispostos em conexões largas que depositam colágeno tipo 3 e 7 e fibras elásticas da matriz extracelular. Já a derme reticular é composta de tecido conectivo colágeno muito mais denso e irregular, com a maior parte composta por colágeno tipo 1 e fibras elásticas, que ajudam a conectar a pele à hipoderme. Essa camada contém fibroblastos, adipócitos, linfócitos, mastócitos, macrófagos assim como glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas (KOBIELAK et al., 2014).

Porém, nos cães a maior parte da pele é pobre em cristas de rede, já que é rica em folículos pilosos, o que fornece um mecanismo adicional para ancoragem da epiderme na derme subjacente. Sendo assim, a pele desses animais é pobre em papilas dérmicas tornando as denominações superficial e profunda, ao invés de papilar e reticular, mais adequadas. Mesmo assim, alguns autores preferem dividir a derme dos animais de forma semelhante à divisão humana (SOUZA et al., 2009; AFFOLTER e MOORE, 1994).

2.3 Células-tronco da pele

Em média 20 tipos celulares diferentes estão presentes na pele. Nos indivíduos adultos, as células-tronco tem a função de reposição dessas células à medida que isso é necessário para a homeostase ou reparo de feridas. As células-tronco têm como características as capacidades únicas de autorrenovação e diferenciação, e são encontradas em muitos tecidos adultos como, por exemplo, medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1966; JUN et al., 2012; SPENCER et al., 2012; CHUNG et al., 2012; PARK et al., 2012), tecido adiposo (ZUK et al., 2001; MARTINELLO et al., 2011; SPENCER et al., 2012; CHUNG et al., 2012; BRONZINI et al., 2012), tecido cardíaco (HODGKISS-GEERE et al., 2012; BELTRAMI et al., 2003; LAJINESS; CONWAY, 2013), polpa dentária (WANG et al., 2013; DISSANAYAKA et al., 2011, PARK et al., 2012), cordão umbilical (JANG et al., 2008), e pele (TOMA et al., 2001; TOMA et al., 2005; KRAUSE et al., 2014; PARK et al., 2012).

A pele é alvo natural de pesquisas com células-tronco pelo fato de ser um órgão grande e facilmente acessível (SELLHEYER; KRAHL, 2009). Segundo Toma et al. (2005) a população ideal de células precursoras seria uma com possibilidade de ser derivada de forma autóloga de biópsias de pequena quantidade de tecidos acessíveis, o que torna a pele um tecido de grande potencial para a obtenção de tais células em indivíduos adultos.

Para a manutenção das características de autorrenovação e diferenciação das células-tronco *in vivo*, um ambiente especializado, denominado nicho, é necessário. Na ausência desse ambiente natural, ou das misturas artificiais de fatores de crescimento encontrados nos meio de cultura para células-tronco *in vitro*, as células começam a se diferenciar. Isso demonstra que, para manterem suas características, essas células são dependentes de fatores que não estão disponíveis em todo o tecido, mas somente nesses nichos isolados (SPRADLING et al., 2008). As células-tronco provenientes dos nichos são, portanto, críticas para a reposição e manutenção do balanço de células (homeostase) no tecido e para a regeneração do tecido danificado após injúria (BLANPAIN et al., 2004).

Um nicho de células-tronco encontrado na pele se situa na região da protuberância do pelo, ou “bulge”, que já foi demonstrada em camundongos, humanos e cães (COTSARELIS et al., 1990; LYLE et al., 1998; PASCUCCI et al., 2006). Segundo Cotsarelis et al. 1990 o “bulge”, em camundongos, se situa na região entre a abertura do ducto da glândula sebácea e o músculo eretor do pelo, e se refere mais precisamente às células da bainha folicular externa dessa região do pelo. Essas células retêm o corante timidina tritiada por períodos prolongados ao longo do ciclo celular e são denominadas “label retaining cells” (LRC - células detentoras de corante). Morris et al. (1999) associaram essa população de células de ciclo lento à células-tronco presentes na pele denominadas células-tronco queratinócitos.

Estas células são capazes de dar origem a todas as células epiteliais do próprio folículo piloso, da glândula sebácea e da epiderme interfolicular sendo, portanto, essa região responsável por prover células não só para o crescimento de novos pelos, mas também para a regeneração da pele (CHRISTIANO, 2008; OSHIMA et al., 2001; TAYLOR et al., 2000). A região do “bulge” foi identificada em cães por Pascucci et al. (2006) e Kobayashi et al. (2010), e corresponde à região encontrada por Cotsarelis et al. (1990).

Os folículos pilosos sofrem ciclos de crescimento compostos pelas fases de crescimento (anágene), regressão mediada por apoptose (catágene), quiescência (telógene) e muda (exógene). O folículo maduro em anágene pode ser dividido em uma região permanente, localizada acima do músculo eretor do pelo, que visivelmente não entra no ciclo, e uma parte inferior, que é remodelada continuamente a cada ciclo de crescimento capilar (STENN; PAUS, 2001). A parte superior, permanente, é composta pelo infundíbulo, que é a abertura do canal do pelo na superfície da pele, e o istmo. O ducto da glândula sebácea se insere na região inferior do infundíbulo. Nessa região, mais proximal, o infundíbulo se junta à região da bainha externa do istmo do folículo piloso, onde o músculo eretor do pelo se insere. A região conhecida como “bulge” se localiza no istmo, no fim da parte permanente do folículo. Entre o “bulge” e o bulbo, que consiste a região da base do folículo em crescimento, existe uma longa faixa de epitélio suprabulbar. O bulbo em anágene contém queratinócitos matriz e a unidade pigmentar do folículo piloso. O

pelo é formado pela rápida proliferação desses queratinócitos matriz que, quando ativados, migraram do “bulge” para colonizar a área da matriz e são células de rápida proliferação. Seu número determina o tamanho do bulbo do pelo e o diâmetro do seu eixo (COTSARELIS, 2006; SCHNEIDER et al., 2009).

As proteínas escolhidas para a marcação de células do “bulge” no presente trabalho são o CD200 e o CD34. O CD200 é uma glicoproteína de superfície celular altamente expressa em células mielóides. Camundongos com deficiência dessa proteína apresentam alterações como aumento do estado de ativação dos macrófagos em vários estudos, e um aumento na susceptibilidade às doenças autoimunes (WRIGHT et al., 2003). Essa proteína foi testada como marcador de células da pele de humanos por Ohyama et al. (2006), que encontraram marcação positiva para CD200 nas células da bainha folicular externa, entre a glândula sebácea e o músculo eretor do pelo, região correspondente ao “bulge”. Por citometria de fluxo eles determinaram que 15 a 20% das células vivas do folículo médio eram CD200 positivas. Além disso, essas células também expressaram marcadores como folistatina e $\alpha 6$ integrina, marcadores de células-tronco queratinócitos do “bulge”.

Em cães, Kobayashi et al. (2010) cultivaram queratinócitos derivados do istmo do pelo de cães, misturaram-nos com células dermais de camundongos neonatos e injetaram essa mistura de células no subcutâneo de camundongos imunodeprimidos. Eles obtiveram com isso, estruturas reconstruídas de folículo piloso em anágene, e de glândulas sebáceas. Além disso, a epiderme contígua também foi regenerada. Nestas estruturas havia a presença de mRNA de CD200, K15 e folistatina, de cão, bem como alguns marcadores de linhagens sebáceas, sugerindo que células do “bulge” canino contribuíram para a reorganização da nova região do “bulge” e das glândulas sebáceas. Porém, este foi o único trabalho encontrado por nós que demonstra a utilização da presença do CD200 como indicador de células do “bulge” na espécie canina.

O CD34 é uma proteína glicosilada de superfície expressa em células hematopoiéticas imaturas e células endoteliais (POBLET; JIMÉNEZ, 2008). Esse marcador também é encontrado positivo no “bulge” de camundongos (TREMUS et al., 2003) e cães (PASCUCCI et al., 2006), e negativo no de humanos (POBLET et

al., 2006; INOUE et al., 2009). A positividade dessa proteína no “bulge” de camundongos foi primeiramente descrita por Trempus et al. (2003). Segundo eles outras estruturas do folículo piloso, como bulbo ou epiderme interfolicular, não expressaram CD34. Por citometria de fluxo (FACS - “fluorescence-activated cell sorting”), eles marcaram as células com CD34 e integrina $\alpha 6$, encontrando uma população de 7 a 8% de células. Além disso, as células CD34 positivas apresentavam-se menores do que as CD34 negativas, o que sugere uma morfologia mais primitiva, e quando separadas por FACS e cultivadas, apresentaram alto potencial proliferativo e formação de grandes colônias.

Em um estudo com pele de cães Pascucci et al. (2006) demonstraram a presença do mRNA do CD34 na área do folículo piloso correspondente a região do “bulge”. As células CD34 positivas foram detectadas claramente na camada celular basal da bainha externa de folículos pilosos primários nas fases de crescimento ou regressão do ciclo capilar. Os folículos em telógene demonstraram que a expressão do CD34 foi restrita à região do istmo do pelo, que não é afetada pelas mudanças associadas à catágene apoptótica. Além disso, segundo eles a expressão do CD34 não teve influência da região do corpo do animal.

Blanpain et al. 2004, estudaram populações de células-tronco residentes no “bulge” do folículo piloso de camundongos. As proteínas CD34, K14, K5 e K15 encontraram-se positivas nas células, basais e suprabasais estudadas, e ambas as populações demonstraram multipotência e capacidade de se diferenciarem em todas as linhagens da epiderme e do folículo piloso. As populações que apresentaram forte marcação por CD34 foram separadas por FACS, e formaram números consideráveis de colônias grandes, firmemente arranjadas contendo células pequenas e de morfologia relativamente indiferenciada, comparada com as células CD34 negativas. Essas células resistiram a várias passagens, indicando que ambas as populações do “bulge” contém células que apresentam as características morfológicas e de autorrenovação de células-tronco quando retiradas de seu nicho nativo e expostas a condições indutoras de proliferação.

Outro autor que também demonstrou a positividade do CD34, juntamente com K15, em queratinócitos do “bulge” de cães foi Kobayashi et al. 2009. Além do CD34 a queratina 15 (K15) também é muito empregada como marcador de células desta

região e, segundo os autores, sua expressão se manteve alta durante todo o ciclo do pelo. Em camundongos, esse marcador foi demonstrado positivo por Morris et al. (2004), que isolaram células K15 positivas do “bulge” de animais adultos e comprovaram que se tratavam de células-tronco epiteliais, já que possuíam potencial proliferativo maior que o de queratinócitos encontrados em outras regiões, e que essas células poderiam reconstituir todos os tipos de células epiteliais da pele. Segundo eles, as células marcadas com K15 são multipotentes e responsáveis pela regeneração do folículo piloso durante o ciclo normal dos folículos da pelagem.

Outros marcadores de células-tronco queratinócitos do “bulge”, segundo Tumber e Fuchs. (2014), são as integrinas. As integrinas $\beta 1$ e $\alpha 6$ encontram-se aumentadas nos cultivos de queratinócitos com alta capacidade proliferativa e também aparecem aumentadas na área correspondente a este nicho, no folículo piloso. Segundo eles, a relação entre as células-tronco e as integrinas, proteínas de adesão celular, sugere a possibilidade de essas células serem mantidas no nicho pela adesão entre as células, e delas à membrana basal, e que uma “downregulation” das integrinas favoreceria a migração dessas células pela membrana basal, através da diminuição da ancoragem ao seu substrato. Outra hipótese é que a proliferação celular seja dependente das integrinas, e portanto as células com alta atividade proliferativa têm nível elevado de integrinas.

Alguns autores comprovaram que as glândulas sebáceas podem ter como origem as células do “bulge” do folículo piloso (MORRIS et al., 2004; BLANPAIN et al., 2004). Horsley et al. (2006) descobriram uma população de células expressando o fator de transcrição Blimp1 (também conhecido como PRDM1) que residem na glândula sebácea. A perda de Blimp1 resulta em glândulas sebáceas maiores com número de células progenitoras de ciclo lento e células proliferativas aumentados, acompanhados pelo aumento na expressão de c-myc. Os autores chegaram à conclusão de que a população marcada por Blimp1 é de progenitores onipotentes, que controlam a homeostase da glândula e governam a atividade das células-tronco do “bulge”.

Um segundo nicho de células-tronco que pode ser encontrado na pele é localizado ao longo dos vasos sanguíneos, e consiste nas células perivasculares. Esse nicho de células já foi sugerido por Meirelles et al. (2006), que isolaram

células-tronco mesenquimais de diferentes órgãos em camundongos. Dentre eles, cultivos de células da aorta, da veia cava e de estruturas compreendendo somente capilares, no caso os glomérulos do rim, foram cultivadas e demonstraram diferenciação osteogênica e adipogênica, além de propriedades de autorrenovação, características essas de células-tronco mesenquimais. Com esses resultados, eles concluíram que existem compartimentos perivasculares de células-tronco mesenquimais.

Crisan et al. (2008), através de imuno-histoquímica realizada em vários órgãos humanos, chegaram a dois marcadores, expressos ubiquamente nas células perivasculares, ao redor de capilares e arteríolas, o CD146 e o NG2. O CD146 é uma molécula de adesão celular presente na superfície da célula e envolvida no processo de adesão entre as células e com a matriz extracelular (WANG et al., 2013), mediando a adesão das células endoteliais (BARDIN et al., 2001) e é fortemente expressa em perícitos dos capilares da derme (LI et al., 2003). O NG2 é um proteoglicano, componente da superfície celular presente na neovascularização, tanto vasculogênica quanto angiogênica. Essa proteína participa da morfogênese vascular embrionária, estando presente na formação da macrovasculatura e microvasculatura embrionária em camundongos (OZERDEM et al., 2001).

Crisan et al. (2008) separaram por FACS uma população positiva para CD146, e negativa para CD34, CD45 (marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais) e CD56 (marcador de células miogênicas). Essas células foram diferenciadas, em miotubos, contendo em média 15 núcleos, e injetadas em músculo esquelético de camundongos imunodeprimidos, que tinham sofrido injúria por injeção de uma cardiotoxina. Três semanas depois esses camundongos apresentavam miofibrilas expressando espectrina humana. Esses resultados, segundo os autores, confirmam que as células perivasculares separadas estritamente de músculo esquelético são dotadas de potencial miogênico. Além disso, células perivasculares cultivadas, derivadas de placenta, tecido adiposo e pâncreas também apresentaram potencial para gerar miotubos em cultivo, e para originar miofibrilas expressando distrofina e espectrina humanas, quando transplantadas em camundongos. Além disso, essas células perivasculares

possuem imunofenótipo de células-tronco mesenquimais e potencial de diferenciação osteogênico, condrogênico e adipogênico.

Ruetze et al. (2013), isolaram duas populações de células, sendo elas da derme reticular e da derme papilar de humanos, sendo a segunda muito vascularizada, e observaram que a derme papilar rendeu cinco vezes mais células progenitoras da pele do que a reticular. Essas células expressam o marcador de células perivasculares CD146. Ao que concerne às estruturas do pelo a bainha mesenquimal do eixo do pelo, a papila dérmica e ao infundíbulo não houve positividade para este marcador. A mesma negatividade pôde ser observada na glândula sebácea. Essas células foram separadas por FACS, com marcação positiva para CD146 e negativa para CD31, CD34, CD45 e CD56 negativa, e representam 2% da população total dos isolados primários.

Além das células contidas nos nichos do bulge do folículo piloso e das células perivasculares outras células-tronco provenientes da pele também já foram reportadas. Os primeiros a descreverem a população de células-tronco progenitoras da pele foram Toma et al. (2001). Esses autores isolaram uma população de células de camundongos que, depois de cultivadas sem fatores de crescimento, apresentaram 60% de marcação positiva para nestina, um marcador de células-tronco do sistema nervoso e de precursores neurais. As células cultivadas não aderiram ao plástico no primeiro cultivo e nem nos seguintes, formando um aglomerado de células em formato de esferas flutuantes. Além dos marcadores neurais, quando essas células foram submetidas a estímulo adequado elas diferenciaram em células de tecidos mesodermiais. Em comparação com células mesenquimais, as células derivadas da pele expressaram nestina e fibronectina, enquanto as células mesenquimais expressaram em altos níveis vimentina e fibronectina.

Outros autores a isolarem células progenitoras da pele que expressam nestina, vimentina, fibronectina e Sca-1 (marcador de células precursoras) foram Fernandes et al. (2004). Esses autores obtiveram, após a indução da diferenciação, células semelhantes a neurônios catecolaminérgicos e a células de Schwann. Além disso, eles apontaram a papila do folículo de pelos comuns e de pelos Whisker como nichos endógenos de células progenitoras da pele. Eles consideram que essas são

células precursoras adultas relacionadas com a crista neural que chegaram à pele durante a embriogenese e persistem durante a vida adulta. Segundo eles as células progenitoras da pele são multipotentes, já que possuem capacidade de diferenciação em neurônios, células da glia, células da musculatura lisa e adipócitos, e são precursores relacionados à crista neural.

Além das células-tronco encontradas no folículo piloso, recentemente foram também encontradas células-tronco nas glândulas sudoríparas. Lu et al. (2012), perceberam que as células no ducto das glândulas sudoríparas em desenvolvimento sofrem mais ciclos de proliferação do que as células mioepiteliais, mas que a glândula sudorípara inteira é amplamente estática após a maturidade. Em contraste, as células basais do ducto sudoríparo permanecem proliferativas. Segundo eles, células basais purificadas de ductos dão origem a glândulas e ductos em raros casos, enquanto homólogos mioepiteliais purificados formam consistentemente glândulas sudoríparas.

Outro tipo celular importante contido na pele são os fibroblastos, presentes também em vários outros tecidos do corpo. Normalmente eles se encontram em estado relativamente quiescente, sendo responsáveis pela produção e turnover da matriz extracelular. No processo de cura de feridas uma série de eventos consecutivos e sobrepostos ocorre, sendo eles a proliferação celular, migração, deposição de matriz extracelular (fibrinogênio), resolução e remodelamento. Nesse processo, os fibroblastos se movem para a matriz provisória e são a principal base do fibrinogênio, secretando proteínas importantes para a matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, que constituem o tecido de granulação formado, provendo integridade estrutural à ferida, enquanto fibroblastos especializados, chamados miofibroblastos, fornecem a força para a contração da ferida, reação importante para a mesma se fechar (DARBY et al., 2007).

Um problema encontrado no cultivo dos fibroblastos é a ineficiência em sua marcação e distinção de outros tipos celulares como, por exemplo, células-tronco mesenquimais. Segundo Hematti, (2012) não existem diferenças na metodologia de derivação do cultivo, morfologia, padrão de expressão gênica de marcadores de superfície, potencial de diferenciação e nem de expressão gênica que

consistentemente e inequivocamente distingam células-tronco mesenquimais cultivadas *ex vivo* de fibroblastos.

Lorenz et al. (2008) fizeram uma comparação entre células mesenquimais fibroblásticas da derme de humanos, obtidas da pele do prepúcio, com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Através de análise por citometria de fluxo eles encontraram nos fibroblastos expressão de marcadores de superfície como CD90, CD29, CD44, CD71, CD73, CD105 e CD166, marcadores específicos de células-tronco mesenquimais. Em contraste, não foram encontradas marcações positivas para CD31 e CD34, marcadores endoteliais de superfície celular, nem para CD45, CD14 e CD133, marcadores de células hematopoiéticas. Esse perfil de marcadores encontrado nos fibroblastos é bem similar ao perfil normalmente encontrado em células-tronco mesenquimais. Outra característica encontrada por esses autores foi a capacidade dos fibroblastos em sofrerem diferenciação adipogênica e osteogênica sob estímulo adequado.

2.4 Conclusão

Com isso percebemos que as características dos diferentes tipos de células-tronco observadas pelos vários autores citados, conferem a elas o potencial para terapias de transplante de células-tronco, representando, a pele, uma fonte adulta acessível de precursores neurais, que podem ser usados para o tratamento de danos ao sistema nervoso, de folículos pilosos, para o tratamento de desordens relacionadas, por exemplo, a alopecias, e de precursores epidermais e dermais, para o tratamento das desordens cutâneas e injúrias como queimaduras, cortes e até no caso de enxertos para cirurgias reconstrutivas. Além da abordagem terapêutica Toma et al. (2005) também sugerem que as células derivadas da pele são de grande interesse para a triagem e pesquisas de várias doenças em pacientes com predisposições genéticas a doenças variando entre a doença de Alzheimer e a esquizofrenia.

Para o presente trabalho, amostras de pele de indivíduos adultos e em fase fetal foram coletadas, para comparação entre elas, pois existem diferenças quanto à capacidade de proliferação das células mais jovens em relação às adultas. As

células fetais, por exemplo, não possuem as mutações, que são acumuladas pelos indivíduos adultos, e por isso podem oferecer maior potencial proliferativo e plasticidade do que as células-tronco dos adultos (TAN et al., 2014).

O foco deste estudo é a espécie canina, uma vez que paralelos na fisiologia, apresentação de doenças e respostas clínicas entre os seres humanos e os cães fazem dessa espécie um modelo experimental muito utilizado em pesquisa (SCHNEIDER et al., 2010).

3. REFERÊNCIAS

AFFOLTER, V. K. e PETER F. MOORE, P. F. Histologic Features of Normal Canine and Feline Skin. **Clinics in Dermatology**. v. 12, p. 491-497, 1994.

BANKS W.J. 1992. Histologia Veterinária Aplicada. 2ª ed. Manole, São Paulo. 629p.

BARDIN, N.; ANFOSSO, F.; MASSÉ, J.; CRAMER, E.; SABATIER, F.; BIVIC A. L.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F.; Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. **Blood**. v. 98, p. 3677-3684, 2001.

BELTRAMI, A. P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, H.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K.; LERI, A.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. **Cell**. v.114, p.763-776, 2003.

BIERNASKIE, J.; PARIS, M.; MOROZOVA, O.; FAGAN, B. M.; MARRA, M.; PEVNY, L.; MILLER, F. D. SKPs Derive from Hair Follicle Precursors and Exhibit Properties of Adult Dermal Stem Cells. **Cell Stem Cell**. v. 5 p. 610–623, 2009.

BLANPAIN, C.; LOWRY, W. E.; GEOGHEGAN, A.; POLAK, L.; FUCHS, E.; Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. **Cell**. v. 118, p.635–648, 2004.

BLANPAIN, C. e FUCHS, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 22, p.339–373 2006.

BOYCE, S. T. Design principles for composition and performance of cultures skin substitutes. **Burns**. v. 27 p. 523–533, 2001.

BRONZINI, I. ; PATRUNO, M.; IACOPETTI, I.;MARTINELLO, T. Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application. **The Veterinary Journal**. v. 194, p. 121- 123, 2012.

CHRISTIANO, A. M. Hair Follicle Epithelial Stem Cells Get Their Sox On. **Cell Stem Cell**. v. 3, p. 3-4, 2008.

CHUNG, D.J.; HAYASHI, K.; TOUPADAKIS, C. A.; CLARE, A. W.; YELLOWLEY, E. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Research in Veterinary Science**. v.92, p 66-75, 2012.

CIBELLI, J.; EMBORG, M. E.; PROCKOP, D. J.; ROBERTS, M.; SCHATTEN, G.; RAO, M.; HARDING, J.; MIROCHNITCHENKO, O.; Strategies for Improving Animal Models for Regenerative Medicine. **Cell Stem Cell**. v. 12, p. 271-274, 2013.

COTSARELIS, G.; SUN, T.; LAVKER, R. M.; Label-Retaining Cells Reside in the "bulge" Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis. **Cell**. v. 61, p. 1329-1337, 1990.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C.; CORSELLI, M.; PARK, T. S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P.; TRAAS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B. M.; BADYLAK, S; BUHRING, H.; GIACOBINO, J.; LAZZARI, L.; HUARD, J.; PEULT, B.; A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**. v. 3, p. 301–313, 2008.

DARBY, I. A.; e HEWITSON, T. D.; Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. **International Review of Cytology**. v. 257, p. 143-179, 2007.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; CHENGFEI, Z.; JIN, L. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. **Journal of Endodontics**. v. 37, p. 1074-1080, 2011.

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

FERNANDES, K. J. L.; MCKENZIE, I. A.; MILL, P.; SKITH, K. M.; AKHAVAN, M.; BERNABÈ-HEIDER, BIERNASKIE, J.; JUNEK, A.; KOBAYASHI, N. R.; TOMA, J. G.; KAPLAN, D. R.; LABOSKY, P. A.; RAFUSE, V.; HUI, C.; MILLER, F. D. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. **Nature Cell Biology**. v. 6, p. 1082-1093, 2004.

FORDHAM, R. P.; JENSEN, K. B.; Reporting Live from the Epidermal Stem Cell Compartment. **Cell Stem Cell**. v. 11, p. 141-142, 2012.

FRANCES, D.; NIEMANN, C.; Stem cell dynamics in sebaceous gland morphogenesis in mouse skin. **Developmental Biology**. v. 363 p. 138–146, 2012.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**. v. 16, p 381-390, 1966.

FUCHS E.; MERRILL, B. J.; JAMORA, C.; DASGUPTA, R.; At the Roots of a Never-Ending Cycle. **Developmental Cell**. v. 1, p. 13–25 2001.

GREEN, H. The birth of therapy with cultured cells. **BioEssays**. v.30, p. 897–903, 2008.

HARDING, J.; ROBERTS, R. M.; MIROCHNITCHENKO, O.; Large animal models for stem cell therapy. **Stem Cell Research & Therapy**. v. 4 n. 23, 9p., 2013.

HARGIS, A. M. Sistema Tegumentar. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial**. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. Cap. 11, p. 486-540.

HEMATTI, P. Mesenchymal stromal cells and fi broblasts: a case of mistaken identity? **Cytotherapy**. v. 14, p. 516–521, 2012.

HODGKISS-GEERE, H. M.; ARGYLE, D. J.; CORCORAN, B. M.; WHITELAW, B.; MILNE, E., BENNETT, D.; ARGYLE, S. A. Characterisation and cardiac directed differentiation of canine adult cardiac stem cells. **The Veterinary Journal**. v. 191, p.176-182, 2012.

HORN, P. A.; MORRIS, J. C.; NEFF, T.; KIEM, H; Stem Cell Gene Transfer-Efficacy and Safety in Large Animal Studies. **Molecular Therapy**. v. 10, N. 3, p.417-431, 2004.

INOUE, K.; AOI, N.; SATO, T.; YAMAUCHI, Y.; SUGA, H.; ETO, H.; KATO, H.; ARAKI, J.; YOSHIMURA, K.; Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. **Lab Invest**. v. 89, p. 844–856, 2009.

JAHODA, C. A. B.; WHITEHOUSE, C. J.; REYNOLDS, A. J.; HOLE, N.; Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. **Experimental Dermatology**. v. 12, p. 849–859, 2003.

JANG, B.; BYEON, Y.; LIM, J.; RYU, H.; KIM, W.; KOYAMA, Y.; KIKUCHI, M.; KANG, K.; KWEON, O. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. **Journal Veterinary Science**. v.9, p.387-393, 2008.

JUN,C.; ZHIHUI, Z.; LU, W.; YAOMING, N.; LEI, W.; YAO, Q.; ZHIYUAN, S. Canine bone marrow mesenchymal stromal cells with lentiviral mHCN4 gene transfer create cardiac pacemakers. **Cytotherapy**. v.14, p. 529–539, 2012.

KAMEL, R. A.; ONG, J. F.; ERIKSSON, E.; JUNKER, J. P. E.; CATERSON, E. J. Tissue Engineering of skin. **Journal of the American College of Surgeons**. v. 217, p. 533-555, 2013.

KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I.; Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 324, p. 1–9, 2013.

KOBIELAK, K.; KANDYBA, E.; LEUNG, Y. Skin and Skin Appendage Regeneration. In: ATALA, A.; ALLICKSON, J. **Translational Regenerative Medicine**. 1.Ed. San Diego: Academic Press, 2014. Cap. 22, p. 269-292.

KOBAYASHI, T., SHIMIZU, A.; NISHIFUJI, K.; AMAGAI, M.; IWASAKI, T.; OHYAMA, M.; Canine hair-follicle keratinocytes enriched with bulge cells have the highly proliferative characteristic of stem cells. **Veterinary Dermatology**. v. 20, p. 338–346, 2009.

KOBAYASHI, T.; IWASAKI, T.; AMAGAI, M.; OHYAMA, M.; Canine Follicle Stem Cell Candidates Reside in the Bulge and Share Characteristic Features with Human Bulge Cells. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 130, p. 1988–1995, 2010.

KRAUSE, M. P.; DWORSKI, S.; FEINBERG, K.; JONES, K.; JOHNSTON, A. P. W.; PAUL, S.; PARIS, M.; PELES, E.; BAGLI, D.; FORREST, C. R.; KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Direct Genesis of Functional Rodent and Human Schwann Cells from Skin Mesenchymal Precursors. **Stem Cell Reports**. v. 3, p.1-16, 2014.

LAJINESS, D. J.; CONWAY, S. J.; Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology*. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.003>.

LAVKER, R. M.; SUN, T. Epidermal stem cells: Properties, markers, and location. **PNAS**. v. 97, p. 13473–13475, 2000.

LI, Q.; YU, Y.; BISCHOFF, J.; MULLIKEN, J. B.; OLSEN, B. R.; Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. **Journal of Pathology**. v. 201, p. 296–302, 2003.

LORENZ, K.; SICKER, M.; SCHMELZER, E.; RUPF, T.; SALVETTER, J.; SCHULZ-SIEGMUND, M.; BADER, A.; Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. **Experimental Dermatology**. v. 17 p. 925–932, 2008.

LU, C. P.; POLAK, L.; ROCHA, A. S.; PASOLLI, H. A.; CHEN, S.; SHARMA, N.; BLANPAIN, C.; FUCHS, E.; Identification of Stem Cell Populations in Sweat Glands and Ducts Reveals Roles in Homeostasis and Wound Repair. **Cell**. v. 150, p.136–150, 2012.

LYLE, S.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; LIU, Y.; ELDER, D. E.; ALBELDA, S.; COTSARELIS, G.; The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. **Journal of Cell Science.** v. 111, p. 3179-3188, 1998.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science.** v. 91, p. 18-24, 2011.

MEIRELLES, L. S.; CCHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B.; Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science.** v. 11, p. 2204-2213 2006.

MORRIS, R. J.; POTTEN, C. S.; Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. **Journal of Investigative Dermatology** v. 112, p. 470-475, 1999.

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

OHYAMA, M.; TERUNUMA, A.; TOCK, C. L.; RADONOVICH, M. F.; PISE-MASISON, C. A.; HOPPING, S. B.; BRADY, J. N.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C.; Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. **The Journal of Clinical Investigation.** v.116, p. 249-260, 2006.

OSHIMA, H.; ROCHAT, A.; KEDZIA, C.; KOBAYASHI, K.; BARRANDON, Y.; Morphogenesis and Renewal of Hair Follicles from Adult Multipotent Stem Cells. **Cell.** v. 104, p. 233-245, 2001.

OSTRANDER, E. A.; KRUGLYAK, L.; Unleashing the Canine Genome. **Genome Research.** v. 10, p. 1271-1274, 2000.

OZERDEM, U.; GRAKO, K. A.; DAHLIN-HUPPE, K.; MONOSOV, E.; STALLCUP, W. B.; NG2 Proteoglycan is Expressed Exclusively by Mural Cells During Vascular Morphogenesis. **Developmental Dynamics.** v. 222, p. 218-227, 2001.

PARK, B.; KANG, E.; BYUN, J.; SON, M.; KIM, H.; HAH, Y.; KIM, T.; KUMAR, B. M.; OCK, S.; RHO, G. *In vitro* and *in vivo* osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. **Differentiation.** v. 83, p. 249-259, 2012.

PASCUCCI, L.; MERCATI, F.; GARGIULO, A. M.; PEDINI, V.; SORBOLINI, S.; CECCARELLI, P.; CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmus region of canine hair follicles. **Veterinary Dermatology.** v. 17, p. 244-251, 2006.

PASTUSHENKO, I.; PRIETO-TORRES, L.; GILBERT, Y.; BLANPAIN, C.; Skin stem cells: at the frontier between the laboratory and clinical practice. Part1: Epidermal stem cells. **Actas Dermosifiliogr.** v. 106, p. 725-732, 2015.

POBLET, E.; JIMENEZ, F.; GODINEZ, J. M.; PASCUAL-MARTIN, A.; IZETA, A.; The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the “bulge” marker CK15. **Clinical and Experimental Dermatology.** v. 31, p. 807–812, 2006.

POBLET, E.; JIMENEZ, F.; CD10 and CD34 in fetal and adult human hair follicles: dynamic changes in their immunohistochemical expression during embryogenesis and hair cycling. **British Journal of Dermatology.** v. 159, p. 646–652, 2008.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H.; Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature.** v. 265, p. 421-424, 1977.

RUETZE, M.; KNAUER, T.; GALLINAT, S.; WENCK, H.; ACHTERBERG, V.; MAERZ, A.; DEPPERT, W.; KNOTT, A. A novel niche for skin derived precursors in non-follicular skin. **Journal of Dermatological Science.** v. 69, p. 132–139, 2013.

SCHNEIDER, M. R.; SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R.; The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. **Current Biology,** v. 19, p.132–142, 2009.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; BRAUN, J.; KOLB, H-J.; ADLER, H. Canine embryonic stem cells: State of the art. **Theriogenology.** v. 74, p. 492–497, 2010.

SELLHEYER, K.; e KRAHL, D.; Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology.** v.5 p. 859-865, 2010.

SNIPPERT, H. J.; HAEGEBARTH, A.; KASPER, M.; JAKS, V.; ES. J. H.; BARKER, N.; WETERING, M.; BORN, M.; BEGTHEL, H.; VRIES, R. G.; STANGE, D. E.; TOFTGARD, R.; CLEVERS, H. Lgr6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin. **Science.** v.327, p. 1385-1389, 2010.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.29 p.177-190, 2009.

SPRADLING, A.C.; NYSTUL, T.; LIGHTHOUSE, D.; MORRIS, L.; FOX, D.; COX, R.; TOOTLE, T.; FREDERICK, R.; SKORA, A.; Stem Cells and Their Niches: Integrated Units That Maintain Drosophila Tissues. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXXIII. 2008.

SPENCER, N. D.; CHUN, D.; VIDAL, M.A.; GIMBLE, J.M.; LOPEZ, M. J. *In vitro* expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. **The Veterinary Journal**. v. 191, p. 231-239, 2012.

STENN, K. S.; PAUS, R.; Controls of Hair Follicle Cycling. **Physiological reviews**. v. 81, p. 449-494, 2001.

TAN, K. K. B.; SALGADO, G.; CONNOLLY, J. E.; CHAN, J. K. Y.; LANE, E. B. Characterization of Fetal Keratinocytes, Showing Enhanced Stem Cell-Like Properties: A Potential Source of Cells for Skin Reconstruction. **Stem Cell Reports**. v. 3, p.324-338, 2014.

TAYLOR, G.; LEHRER, M. S.; JENSEN, P. J.; SUN, T.; LAVKER, R. M.; Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. **Cell**. v. 102, p.451–461, 2000.

TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J. L.; BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D.; Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**. v. 3 p.778-784, 2001.

TOMA, J. G.; McKENZIER, I. A.; BAGLI, D.; MILLER, F. D.; Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. **Stem Cells**. v.23 p. 727-737, 2005.

TREMPUS, C S.; MORRISN R. J.; BORTNER, C. D.; COTSARELIS, G.; FAIRCLOTH, R. S.; REECE, J. M.; TENNANT, R. W.; Enrichment for Living Murine Keratinocytes from the Hair Follicle “bulge” with the Cell Surface Marker CD34. **Journal of Investigative Dermatology**. v.120, p. 501-511, 2003.

TUMBAR, T.; FUCHS, E. Epithelial skin stem cells. In: LANZA, R.; ATALA, A. *Essentials of Stem Cell Biology*. 3. ed. Nova York: Elsevier, 2014. Cap 15, p. 203-218.

WANG, T.; ZHAO, H.; ZHAN, Q.; XU, C.; LIU, C. Generation of Transgene-free Induced Pluripotent Stem Cells with Non-viral Methods. **Chinese Medical Sciences Journal**. v. 28, p.50-54, 2013.

WRIGHT, G. J.; CHERWINSKI, H.; FOSTER-CUEVAS, M.; BROOKE, G.; PUKLAVEC, M. J.; BIGLER, M.; SONG, Y.; JENMALM, M.; GORMAN, D.; McCLANAHAN, T.; LIU, M.; BROWN, M. H.; SEDGWICK, J. D.; PHILLIPS, J. H.; BARCLAY, A. N.; Characterization of the CD200 ReceptorFamily in Mice and Humans and Their Interactions with CD200. **Journal of Immunology**. v, 171, p. 3034-3046, 2003.

ZHANG, D.; KILIAN, K. A. The effect of mesenchymal stem cell shape on the maintenance of multipotency. **Biomaterials**. v.34 p. 3962-3969, 2013.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**. v.7, p. 211-228, 2001.

CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE NA ESPÉCIE CANINA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, Jaboticabal, Brasil;

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO CD200 E CD34 POSITIVAS DA PELE NA ESPÉCIE CANINA;

Raquel V. G. de Castro¹, Mariana R. Tavares¹, Fabiana F. Bressan², Naira C. G. Pieri³, Carlos E. Ambrósio², Joaquim M. Garcia¹.

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

² Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo.

³ Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CONTEÚDO

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença, em cultivos celulares de pele de cão, de populações de células-tronco do “bulge” do folículo piloso. Com isso procurou-se obter populações celulares com características mais específicas de células-tronco, como autorrenovação, proliferação e capacidade de diferenciação e, portanto com melhor desempenho nas terapias regenerativas. Populações celulares originárias de fetos e adultos foram comparadas quanto à presença de células com essas características, pois sabe-se que células de idades diferentes comportam-se de maneiras diferentes.

Métodos

A presença de células-tronco derivadas da pele, em cães, foi analisada em tecidos e cultivos celulares fetais e adultos através da detecção das proteínas de membrana CD34 e

CD200, em busca da população de células do “bulge” do folículo piloso, através de imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo.

A proteína CD200 foi escolhida, pois sua expressão na pele é restrita às células do “bulge” do folículo piloso, região conhecida por ser um nicho de células-tronco responsável pela regeneração do pelo e da epiderme. O CD34, apesar de expresso em outros tipos celulares, também é expresso nesse nicho, na espécie canina, e marca células específicas do “bulge”.

Resultados

Nos testes de imunofluorescência, ambos os marcadores CD200 e CD34 apresentaram-se negativos tanto para a pele de adultos quanto para a de fetos. Na imunocitoquímica os marcadores CD34 e CD200 foram positivos em cultivos de adultos e fetos, e o marcador de pluripotência OCT4 foi positivo no cultivo de células de feto. Por citometria de fluxo, a porcentagem média de células duplo marcadas por CD200 e CD34 nos adultos foi de 3,1% e nos fetos de 0,33% (n=3). A marcação somente por CD200 foi encontrada unicamente nos adultos, sendo de 2,8% (n=3).

Conclusão

Os resultados sugerem ser possível a obtenção de células-tronco do “bulge” do folículo piloso através do método de digestão enzimática simples, utilizado neste trabalho. Este estudo é o primeiro passo para novas pesquisas que envolvam esse nicho, na pele de cães.

RESUMO

A pele é um órgão extenso e de fácil acesso, e possui vários tipos celulares diferentes que estão em constante renovação. Dentre estas células, alguns tipos de células-tronco com potencial para autorrenovação, proliferação e diferenciação, são responsáveis pela manutenção da homeostase deste órgão e pela cura de feridas. Estudos anteriores sugerem a existência de um nicho de células-tronco presente no “bulge” dos folículos pilosos, que contém populações positivas para CD200 e CD34. Este trabalho foi realizado com o intuito de: 1. Obter tecidos derivados da pele de cães adultos e fetos, isolar e cultivar as células *in vitro* derivadas destes, empregando um método de isolamento celular através de digestão

enzimática simples; 2. Comprovar a presença de células positivas CD200 e CD34 nos cultivos *in vitro* comparando com a análise do tecido. Biopsias de pele de cães adultos e fetos foram analisadas quanto à morfologia pela análise histológica em coloração hematoxilina-eosina e as biopsias e células cultivadas *in vitro* foram caracterizadas pela presença das proteínas de membrana CD200 e CD34, através de imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo. Os resultados da imunofluorescência foram negativos para ambos os marcadores CD200 e CD34, tanto para a pele de adultos quanto para a de fetos. Na imunocitoquímica tanto o CD34 quanto o CD200 apresentaram-se positivos para as células de adultos e fetos. Por citometria de fluxo, a porcentagem média de células marcadas duplamente por CD200 e CD34 nos adultos foi de 3,1% e nos fetos de 0,33% (n=3). A marcação somente por CD200 foi encontrada somente nos adultos, sendo de 2,8% (n=3). Em conclusão, neste estudo foi possível a obtenção de uma população de células-tronco do “bulge” do folículo piloso da pele de cães adultos e fetos, marcada por CD200 e CD34, pelos métodos de isolamento, através de digestão enzimática simples, e cultivo celular utilizados, porém não foi possível confirmar a localização desse nicho diretamente na pele.

INTRODUÇÃO

A pele é um órgão extenso e complexo com diversos arranjos de células organizadas originárias de diferentes camadas embrionárias, sendo duas as suas camadas principais: epiderme (originada da ectoderme) e derme (originada da mesoderme) (Blanpain e Fuchs 2006). A epiderme e seus apêndices são compostos por células epiteliais especializadas, os queratinócitos, enquanto a derme é composta por células mesenquimais (Tumbar e Fuchs 2014).

Soluções de continuidade na pele, como queimaduras extensas e grandes feridas, são um grande desafio encontrado na rotina de médicos e veterinários. Portanto, a tentativa de encontrar um enxerto que substitua a pele nesses casos é motivo de muitos estudos. Uma malha de queratinócitos, retirados do próprio paciente, e cultivados em laboratório até que um volume considerável de células fosse atingido, já foi utilizada com sucesso para restaurar lesões de pele em humanos, por Green et al. (2008). Porém, segundo Tan et al. (2014), a desvantagem de usar células do próprio paciente é o longo período de tempo até que um número considerável de células seja atingido, para sua aplicação. Esses autores sugerem, portanto, células derivadas da pele de fetos, como um possível substituto das células

autólogas. Sendo assim, a avaliação dos cultivos de pele de fetos e adultos, bem como de suas diferenças é importante para o estabelecimento de um substituto mais adequado.

Estudos anteriores comprovam a existência de um nicho de células-tronco presente no “bulge” do folículo piloso da pele de camundongos (Cotsarelis et al., 1990), humanos (Lyle et al., 1998) e cães (Pascucci et al., 2006). Cotsarelis et al. (1990) demonstraram, em camundongos, uma população de células de ciclo lento, capazes de reter o corante timidina tritiada ao longo do ciclo celular, localizada na bainha folicular externa do pelo. Morris et al. (1999) associaram essa população de células às células-tronco queratinócitos. Assim, essas células possuem ciclo lento quando *in vivo*, são autorrenováveis e responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido, podendo ser ativadas quando existem feridas, ou por condições de cultivo *in vitro*, e tem alto potencial proliferativo, segundo revisado por Lavker e Sun (2000). Essas células são capazes de dar origem à epiderme e às células do folículo piloso sendo, portanto, essa região responsável por prover células não só para o crescimento de novos pelos, mas também para a regeneração da pele (Taylor et al., 2000).

O CD200 já foi encontrado positivo no “bulge” do folículo piloso da pele de humanos (Ohyama et al., 2006; Kloepper et al., 2008; Inoue et al., 2009). Em cães, Kobayashi et al. (2010) encontraram o RNAm dos marcadores de “bulge” K15, CD200 e folistatina, e de marcadores de linhagens de glândula sebácea, em estruturas pilo-sebáceas reconstituídas, sugerindo que as células do “bulge” canino contribuíram para a reorganização não só do folículo piloso, como também da glândula sebácea. Isso torna evidente, a multipotência das células dessa região. Além disso, o CD200 é uma molécula associada à diminuição da rejeição a enxertos, e à regulação do sistema imune (Rosenblum et al., 2004; Yu et al., 2013).

O CD34 é um marcador conhecido de células-tronco hematopoiéticas, que também é encontrado positivo nas células da região do “bulge” folicular. Ele encontra-se negativo no “bulge” de humanos (Poblet et al., 2006; Inoue et al., 2009) e positivo no de camundongos (Trempeus et al., 2003) e cães (Pascucci et al., 2006). Tumber et al. (2004) provaram ser possível a separação de uma população de células vivas desta região através da técnica de “fluorescence-activated cell sorting” (FACS), utilizando o marcador CD34. Além deles, Najafzadeh et al. (2015) obtiveram uma população CD34 positiva, por separação magnética, e diferenciaram essas células em células neurais.

Algumas proteínas são conhecidas por sua presença em células pluripotentes. A expressão do Oct4 ocorre em linhagens germinativas, embriões em fase de pré-implantação e em epiblastos pós-implantação, o que torna esse marcador um identificador de células-tronco pluripotentes. (Tada et al., 2001; Capela e Temple, 2002). Por este motivo, a presença dessa proteína também foi verificada.

Desta maneira, o objetivo deste experimento foi provar a existência de populações celulares de “bulge” de folículo piloso, que possam ser obtidas pelo método de digestão enzimática simples empregado, visando sua posterior utilização em protocolos de pesquisa básica ou aplicada, como por exemplo, na medicina regenerativa. Para tal, o isolamento e cultivo *in vitro* de células derivadas da pele de cães adultos e fetos e a marcação de membrana para proteínas reportadas em células-tronco de pele (CD200 e CD34) foram realizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das células

Os fragmentos de pele dos animais adultos utilizados neste experimento foram obtidos de cirurgias de rotina realizadas no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, situado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Jaboticabal, com consentimento prévio dos proprietários dos animais, segundo modelo contido no anexo 1. Os fragmentos de pele de fetos foram obtidos da Campanha de Castração, realizada na mesma instituição. Os procedimentos deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob protocolo n°011904/14.

Cultivo celular

Para o isolamento das células, um fragmento de pele hígida, de aproximadamente 2cm² foi obtido de cada um dos três animais adultos, preferencialmente durante procedimentos cirúrgicos ortopédicos, nos quais a incisão é geralmente realizada em regiões onde a pele possui mais folículos pilosos, como os membros ou a região dorsal do animal. Para o isolamento das células fetais, fragmentos de pele de três fetos de gestações distintas e idades entre 40 e 45 dias foram coletados da região torácica lateral. A idade dos fetos foi estimada pela medida da articulação atlanto-occipital até o osso sacro, segundo método de

Evans e Sack (1973). Todos os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar horizontal, para minimizar possíveis contaminações.

Após limpeza e retirada do excesso de tecido subcutâneo, as amostras de pele foram submetidas ao processo de digestão enzimáticas simples, que consiste em cortar a pele em fragmentos de aproximadamente 0,1cm² e coloca-la em digestão por colagenase I (150U/ml ThermoFisher Scientific N° Cat. 17100-017) por 3 horas a 38,5°C. Após este período meio de cultivo, descrito a seguir, foi adicionado para neutralização da enzima, e uma filtragem para retirada dos fragmentos de pele restantes não digeridos foi realizada. A suspensão foi então centrifugada a 300G por 7 minutos para obtenção de um pellet de células, que foi colocado em garrafas para cultivo celular de 25cm² (CORNING®). O meio de cultivo utilizado foi DMEM alta glicose (ThermoFisher Scientific, N° Cat.12100-046) contendo 50% de F-12 *Nutrient Mixture* (Ham) (ThermoFisher Scientific, N° Cat. 21700-075), 0,5% amicacina, 1% aminoácidos não essenciais e 10% de soro fetal bovino.

Após o isolamento as células foram mantidas em cultivo em incubadora a 38,5°C, 5%CO₂ em ar e umidade saturada. As linhagens obtidas foram congeladas tão logo atingiram confluência de 90% na placa de cultivo. No total, foram isoladas e congeladas células da pele de três animais adultos e de três fetos, de gestações distintas. O meio de congelamento utilizado foi composto por 45% de meio de cultivo celular, 45% de soro fetal bovino e 10% de DMSO.

Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo foram realizados no do Laboratório de Imuno-histoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE), situado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga. As amostras de pele de um dos adultos e um dos fetos coletadas foram congeladas em Meio Tissue-Tek O.C.T. Compound (SAKURA N° Cat. SAKU-4583) e armazenadas em freezer - 80°C. Para a imunofluorescência, cortes de pele de 5µm foram feitos em um criostato (SLEE Mainz MEV) e colocados em lâminas Star Frost®, as quais permaneceram secando ao ar ambiente por 30 minutos e, após esse período, foram fixadas em acetona gelada, por 10 minutos em freezer. Três lavagens durante 5 minutos em solução Tampão Salina Tris (TBS) foram realizadas, e após a lavagem procedeu-se o bloqueio com 10% de soro de cabra em

TBS, durante 1 hora em câmara úmida. Após esse período os anticorpos primários (descritos na Tabela 1) foram adicionados aos cortes. No corte controle adicionou-se apenas TBS com 1% de soro de cabra. Os cortes foram mantidos em câmara úmida a 4°C por uma noite. No dia seguinte três lavagens com TBS em 1% de soro de cabra foram realizadas e depois o anticorpo secundário foi colocado, na diluição de 1:500 por 1 hora. Após novas lavagens as lâminas receberam PROLONG® (Gold Antifade Reagent With DAPI - N° Cat. P36935 Thermo Fisher Scientific) e uma lamínula foi colocada sobre os cortes. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência Olympus IX70.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na imunofluorescência, imunocitoquímica e citometria de fluxo.

ANTICORPOS	MARCA	N° CATÁLOGO	DILUIÇÃO
CD34	SANTA CRUZ	sc-7045	1:50
CD200	SANTA CRUZ	sc-323725	1:50
OCT4	SIGMA-ALDRICH	08389	1:100
Alexa Fluor 488 Anti-goat IgG	THERMO FISHER	A11078	1:500
Alexa Fluor 680 Anti-goat IgG	THERMO FISHER	A21084	1:500
Alexa Fluor 488 Anti-rabbit Igg	THERMO FISHER	A11034	1:500
Alexa Fluor 488 Anti-mouse IgG	THERMO FISHER	A21200	1:500

Imunocitoquímica

Para a imunocitoquímica, células de um adulto e um feto foram cultivadas em placas de cultivo de quatro poços (NUNC®). Quando atingiram a confluência foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos, e depois deixadas em PBS até o momento da análise. O cultivo foi lavado com PBS acrescido de 0,1% de Tween 20 (Synth) e 0,1% de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich) (BSA). Depois as células foram deixadas por 20 minutos em PBS com 1% de Triton X-100 (Synth) e então lavadas, e um bloqueio com 1% BSA foi realizado por 1 hora. Os anticorpos primários foram adicionados (Tabela 1) e deixados ao longo da noite, a 4°C. No dia seguinte, após lavagens o anticorpo secundário (Tabela 1) foi adicionado e deixado por 2 horas, à temperatura ambiente e abrigo de luz. Após lavagens, uma gota de PROLONG® (Gold Antifade Reagent With DAPI - N° Cat. P36935 Thermo Fisher Scientific) foi adicionada ao PBS colocado na placa e as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência.

Coloração Hematoxilina Eosina (HE)

Os cortes feitos em criostato, e previamente fixados em acetona gelada por 10 minutos em freezer, foram secos e colocados em álcool 100° por 5 minutos, depois álcool 95° por 5 minutos, álcool 70° por 5 minutos, e depois, água corrente por 5 minutos. Depois foram colocados brevemente em Hematoxilina, retirados e lavados em água corrente. As lâminas foram então mergulhadas brevemente em Eosina e lavadas em água corrente. Uma passagem pelo álcool 70°, seguida por uma pelo álcool 95°, duas passagens pelo álcool 100°, uma por uma mistura de álcool com Xilol (1:1) e depois três passagens por Xilol puro foram realizadas. Uma gota de resina para microscopia (Permount, Fisher Scientific) foi adicionada no corte e a lamínula posicionada em cima do mesmo.

Citometria de fluxo

As análises foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, situado na FCAV – UNESP, Jaboticabal. Um citômetro BD FACS CantoII (BD Biosciences) foi utilizado e os resultados foram obtidos através de utilização do software “BD FACS Diva” Versão 6.1.3 (BD Biosciences). A marcação das células de três adultos e três fetos foi realizada da seguinte maneira: as células foram descongeladas e cultivadas até atingirem a confluência da placa. Elas foram então removidas das placas de cultivo pela adição de 0,2% de EDTA em PBS livre de cálcio e magnésio (DPBS), ressuspensas em uma solução de 0,1% de Tween 20 em DPBS e centrifugadas a 300 g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de solução de bloqueio (1% de BSA em DPBS) por 1 hora. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com 50 µL do anticorpo primário (Tabela 1) por 1 hora, em temperatura ambiente. Após uma lavagem em DPBS contendo 0,1% de Tween 20 e 0,1% de BSA, as amostras foram incubadas com 50µl do anticorpo secundário (Tabela 1) por 1 hora, na ausência de luz. Uma lavagem foi realizada (0,1% BSA + 0,1% Tween 20 em DPBS) e as amostras foram incubadas com o segundo anticorpo primário, da mesma forma que na primeira incubação, por mais 1 hora. Após lavagem, elas foram incubadas com o segundo anticorpo secundário. Para finalizar, as amostras foram fixadas com 200 µL de paraformaldeído 4% em DPBS, e mantidas em DPBS no escuro até a passagem pelo citômetro de fluxo. Para cada um dos animais um tubo marcado com CD200 e CD34, e outro sem marcação nenhuma foi preparado. Para o CD200, o anticorpo secundário empregado foi o

Alexa Fluor 680 e, portanto, este marcador foi lido pelo laser vermelho, filtro 680, no canal do APC. Para o CD34 foi utilizado Alexa Fluor 488 e, portanto, ele foi lido pelo laser azul, filtro 488, no canal do FITC.

RESULTADOS

Cultivo celular

Após a recuperação das células da pele as mesmas foram observadas até atingirem a confluência e congeladas em passagem inicial (P0). A partir de uma quantidade aproximada de 2cm² de tecido coletado, visualmente o cultivo de células fetais apresentava uma maior concentração de células aderidas ao fundo da placa de cultivo celular no dia seguinte ao isolamento, quando comparadas com os adultos, como pode ser visualizado na Figura 1-A e D. Sendo assim, os cultivos derivados de fetos foram congelados no dia seguinte ao isolamento, enquanto as células dos adultos demoraram em média 10 dias entre o dia do isolamento das células e o dia do congelamento.

Tanto o cultivo de células de feto quanto o de adulto apresentaram claramente a formação de colônias de duas morfologias distintas, sendo células mais arredondadas ou células mais alongadas, porém, é importante mencionar que as células de feto utilizadas para os experimentos de imunocitoquímica e citometria de fluxo (fetos de aproximadamente 45 dias de idade) foram congeladas no dia seguinte ao isolamento, e, portanto não percebemos a formação de colônias com morfologias distintas. As células de um quarto feto de aproximadamente 58 dias de idade foram cultivadas, e demoraram 15 dias para serem congeladas. Nesse cultivo foram visualizadas células de duas morfologias distintas (Figura 1-E). As células mais arredondadas geralmente estavam presentes em torno do pelo (Figura 1-B), quando este se encontrava na placa de cultivo, apresentavam-se justapostas, possuíam forma arredondada e alta proporção núcleo citoplasmática. Já as células mais alongadas eram fusiformes e com núcleo menor em relação ao tamanho da célula.

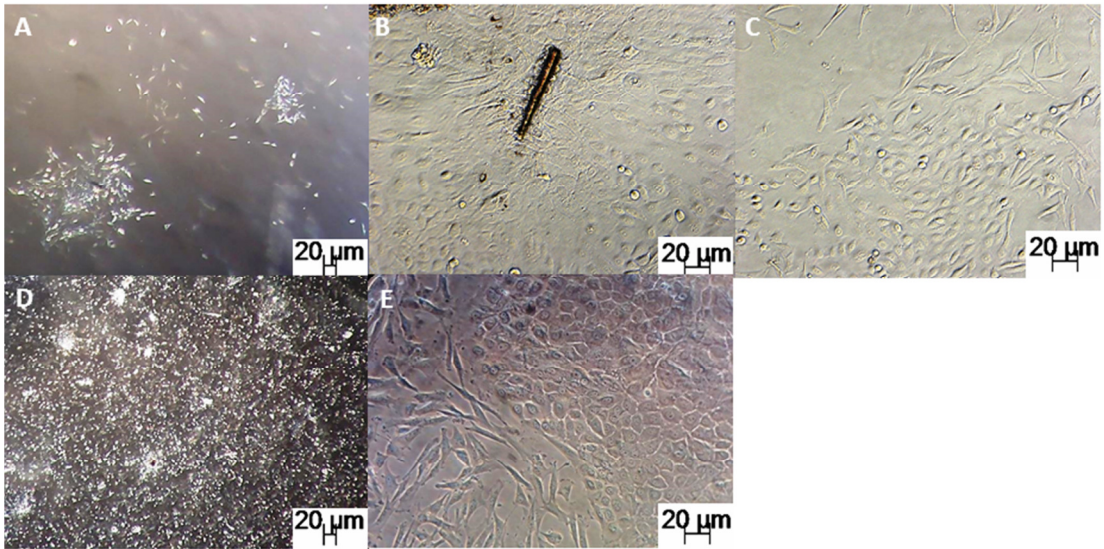


Figura 1. Aspecto das colônias formadas em cultivo de células da pele de adultos (A, B e C) e de fetos (D e E). A- Pele adulto 5° dia de cultivo B- Pele adulto 8° dia de cultivo, presença de pelo C- Pele adulto 8° dia de cultivo, nota-se células de duas morfologias D- Primeiro dia do cultivo em feto de aproximadamente 45 dias de idade E- Nono dia de cultivo em feto de aproximadamente 58 dias, formação de colônias de duas morfologias diferentes.

Coloração Hematoxilina Eosina (HE)

A coloração por HE foi realizada com o objetivo de visualizar as estruturas da pele, e a localização da região do “bulge”. Nela foi possível visualizar glândulas sebáceas e folículos pilosos, em sua maioria em corte transversal (Figura 2-A), e alguns cortes oblíquos (Figura 2-B), porém não foram observados cortes longitudinais. Na secção histológica da pele de feto há estruturas semelhantes a folículos pilosos (Figura 2-C). Não foi possível determinar a localização da região do “bulge” do folículo piloso nem na pele de feto nem na de adulto.

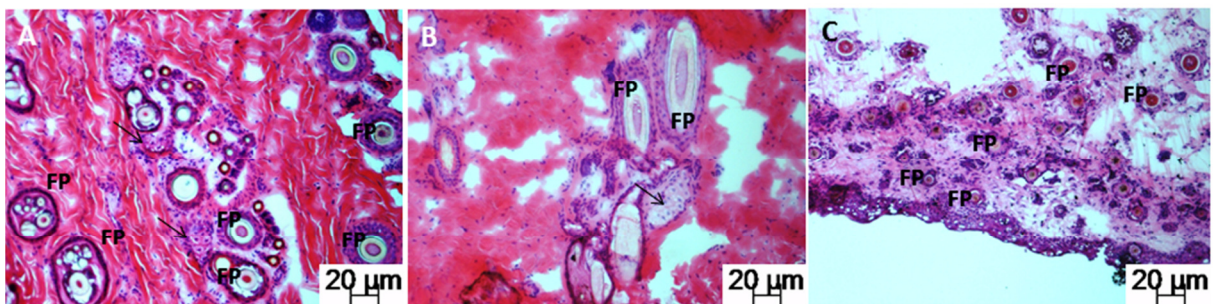


Figura 2. Coloração por hematoxilina e eosina. FP = folículos pilosos, setas = glândula sebácea. A – Cortes transversais em pele de adulto B – Cortes oblíquos em pele de adulto C- Pele de feto de aproximadamente 45 dias

Imunofluorescência

A presença das duas proteínas de membrana, CD200 e CD34, foi investigada por imunofluorescência na pele dos adultos e dos fetos, e seus resultados foram negativos (Figura 3). Um controle foi realizado, no qual se omitiu o anticorpo primário, e seu resultado também foi negativo.

Imunocitoquímica

A presença dos marcadores CD200, CD34 e OCT4 foi investigada no cultivo de células de um feto e de um adulto. O OCT4 marcou somente as células do cultivo de fetos, enquanto CD34 e CD200 encontraram-se positivos no cultivo de pele de fetos e de adultos (Figura 4). Para cada um dos marcadores um controle foi realizado, no qual se omitiu o anticorpo primário. Os controles de todos os testes apresentaram-se negativos.

Citometria de Fluxo

No total, 10.000 aquisições foram feitas pelo citômetro de fluxo para cada marcação, de cada um dos 3 animais. As porcentagens de células positivas encontradas estão listadas na Tabela 2. Para a dupla marcação por CD200 e CD34 a média de células marcadas nos adultos foi de 3,1% e nos fetos de 0,33% (n=3). Nos adultos uma população positiva somente para CD200 foi encontrada, sendo de 2,8% (n=3). Nos fetos essa população não foi encontrada.

Tabela 2. Resultados porcentagens de células CD200 + CD34 e somente CD200 positivas na citometria de fluxo.

PORCENTAGEM CÉLULAS POSITIVAS								
Marcação	5A	6 ^a	7A	1F	2F	4F	Média Adultos	Média Fetos
CD200 + CD34	8,2	0,6	0,6	0,2	0,1	0,7	3,1	0,33
CD200	8,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0

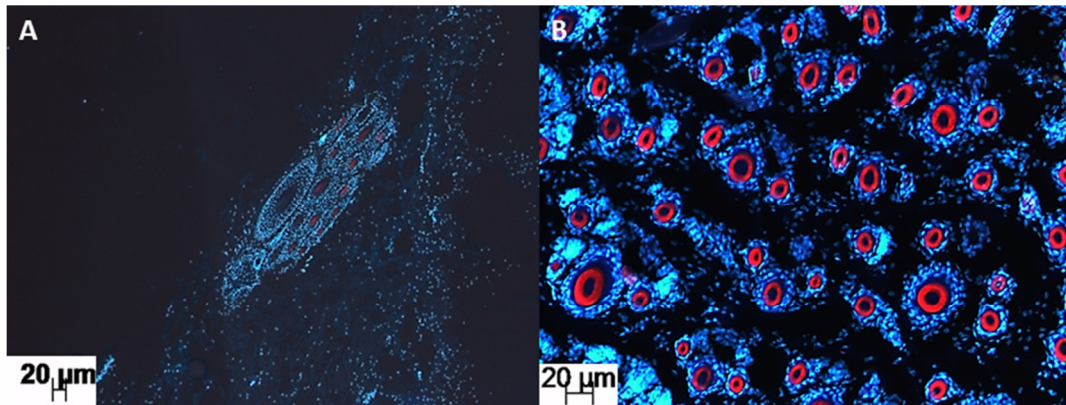


Figura 3. Secções histológicas nos quais foram realizados os testes de imunofluorescência. Em azul verificamos os núcleos, marcados com DAPI. O resultado foi negativo tanto para CD200 quanto para CD34. O pêlo apresenta auto-fluorescência vermelha, sendo necessário desconsidera-la. A- Adulto e B- Feto.

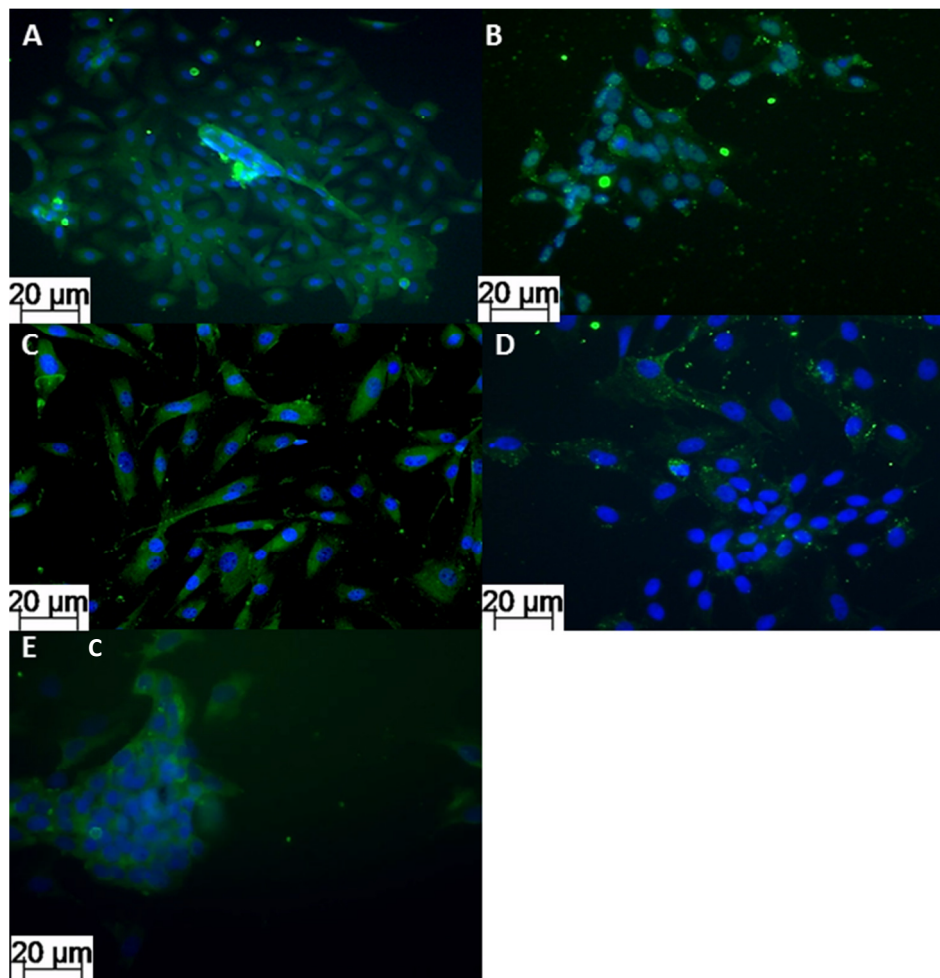


Figura 4. Imunocitoquímica. Presença de marcação por CD34 em cultivo de pele de adulto (A) e feto (B) (verde). Marcação positiva para CD200 em cultivo de pele de adulto (verde) (C) e feto (D) E- Marcação positiva para OCT4 em cultivo de pele de feto (verde).

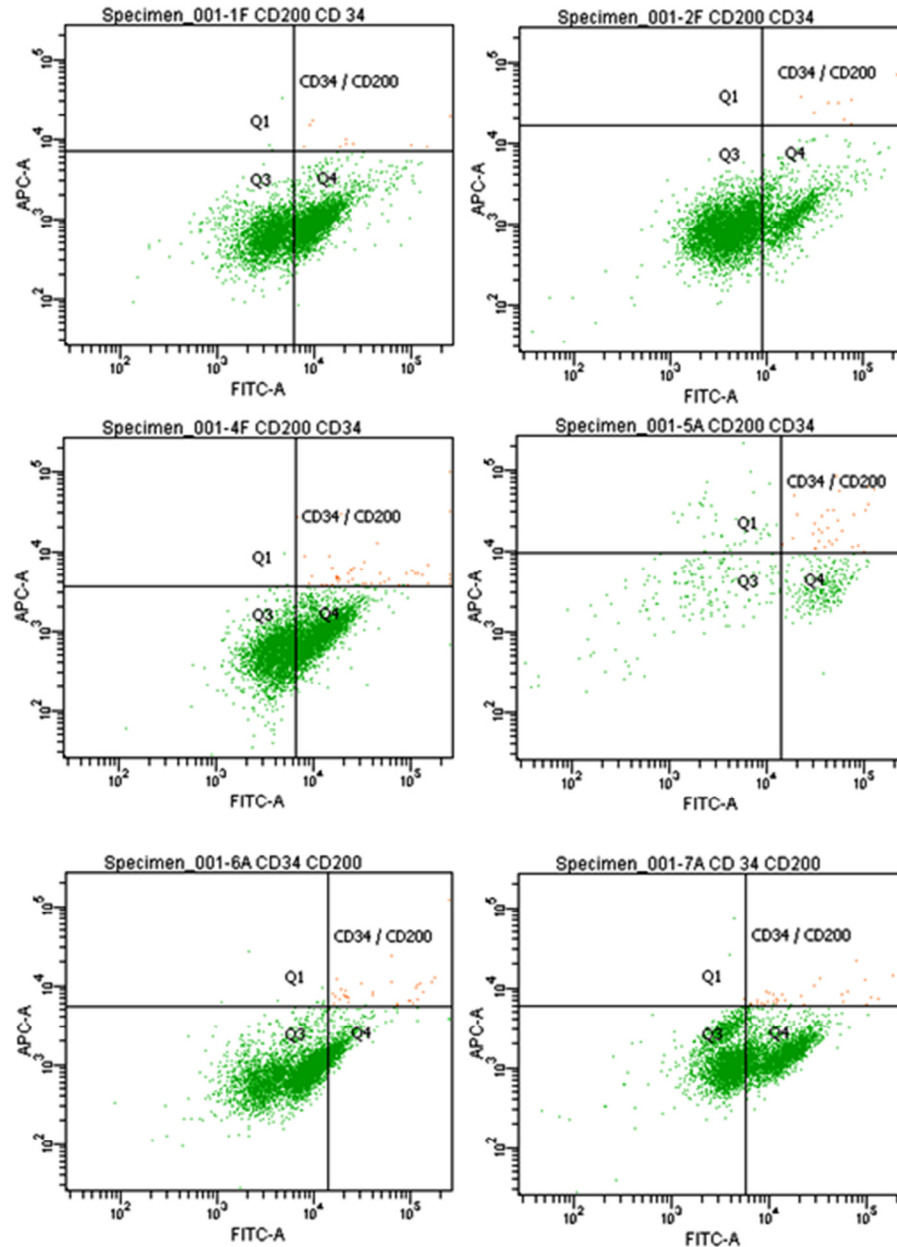


Figura 5. Citometria de fluxo: “Dot plot” da dupla marcação para CD200 (Alexa Fluor 680, visualizado no canal APC-A) e CD34 (Alexa Fluor 488, visualizado no canal do FITC-A) nos experimentos relativos a fetos (três primeiros 1F, 2F e 4F) e relativas a adultos (três últimos 5A, 6Ae 7A).

DISCUSSÃO

Os resultados relativos a diferenças entre a velocidade de crescimento do cultivo celular de fetos e adultos estão de acordo com os de Tan et al. (2014), que verificaram que a proliferação de queratinócitos de fetos é mais rápida do que a de adultos, condizendo com a

observação de que as células cultivadas de feto demoraram menos tempo para atingirem a confluência da placa e serem congeladas do que as de adultos.

A região do “bulge” folicular se situa abaixo da região da abertura da glândula sebácea até a inserção do músculo eretor do pelo, na bainha folicular externa (Ohyama et al., 2006; Pascucci et al., 2006; Kobayashi et al., 2010). Pelas colorações por HE realizadas nas amostras de pele, verificou-se que como os cortes foram transversais e oblíquos não necessariamente a região do “bulge” estava presente, o que justificaria a ausência de marcação para CD200 e CD34 neste tecido.

Segundo Cotsarelis, (2006) o CD34 é um dos marcadores mais específicos para células de folículo piloso de camundongos, e Pascucci et al. (2006) confirmaram que esta proteína está também presente na região do “bulge” de cães. Trempus et al. (2003) demonstraram que a expressão do CD34 em queratinócitos do “bulge” folicular de camundongos coincide com a região das “label retaining cells” (LRC - descritas por Cotsarelis et al., 1990) e que também expressam queratina 15, marcadores estes de queratinócitos do “bulge”. Segundo Kloepper et al. (2008), o CD200 é um dos marcadores mais úteis para células de “bulge” de humanos. Porém este marcador nunca foi encontrado diretamente na região de “bulge” em cães, e portanto uma dupla marcação com CD34 é importante para se ter certeza da localização dessa região. A dupla marcação não foi realizada na imunocitoquímica e nem na imunofluorescência, mas foi realizada nas células passadas pelo citômetro de fluxo. A população de células CD200 e CD34 positivas encontrada foi 3,1% nos adultos e 0,33% nos fetos. Essas populações foram pequenas, o que já é esperado, tendo em vista que o cultivo celular foi feito de uma fração inteira da pele, e as células CD200 e CD34 positivas se encontram somente na região do “bulge” do folículo piloso.

A proteína CD200 já foi comprovada como positiva em humanos (Ohyama et al., 2006; Inoue et al., 2009), e camundongos (Rosenblum et al., 2004). Em cães foram encontrados somente dois trabalhos anteriormente publicados que comprovam a presença do RNAm de CD200 na pele (Gerhards et al., 2016; Kobayashi et al., 2010), porém, em nenhum deles houve marcação desta proteína diretamente na pele, e eles não realizaram o cultivo celular com posterior marcação das células. Segundo Gerhards et al. (2016) não foi observada a marcação por CD200 em testes de imuno-histoquímica com nenhum dos três anticorpos testados por eles. No presente trabalho essa marcação também não foi possível, e a região do

“bulge” não foi encontrada, sendo tanto a marcação por CD200 quanto por CD34 diretamente na pele negativa.

Apesar de não ter sido possível localizar o nicho do “bulge” diretamente na pele, além da população positiva para CD200 e CD34 encontrada por citometria nos adultos foram encontradas, também, células marcadas somente para CD200, na citometria de fluxo (2,8% das células positivas), e no cultivo celular, através da imunocitoquímica, o que sugere que essa proteína esteja realmente presente nas células do “bulge” do folículo piloso de cães. Segundo Ohyama et al. (2006) em humanos a marcação por CD200 foi quase duas vezes maior em células da bainha folicular externa do “bulge” do que nas da região do “sub-bulge”, e a marcação pelo anti-CD200 se restringiu à bainha folicular externa da região do “bulge”, não contemplando as células de regiões próximas a ele. Se essa predileção do CD200 por células do “bulge” se repetir em cães, com o método utilizado no presente trabalho a obtenção de células-tronco do “bulge” do folículo piloso é possível. Porém, mais estudos são necessários para se comprovar a presença de células positivas para CD200 na pele, e a presença desse marcador, no cão, como sendo específico de células-tronco do “bulge”.

Em cultivo Trempus et al. (2003) encontraram que as células CD34 positivas proliferavam formando grandes colônias. No cultivo realizado neste trabalho foi possível encontrar células CD34 positivas, porém por imunocitoquímica, o que impossibilita o acompanhamento da proliferação dessas células. O CD34 é um marcador confirmado de células da região do bulge, porém está presente, também na bainha folicular externa do istmo, na região suprabulbar e, dependendo da fase do ciclo capilar, em outras regiões do folículo (Gerhards et al., 2016), e portanto não é um marcador tão específico de células do “bulge”.

Yu et al. 2006 cultivaram células-tronco de pele em meio de cultivo igual ao utilizado em células-tronco embrionárias e obtiveram aglomerados de células não aderentes. Eles encontraram neste cultivo poucas células positivas para OCT4. Mesmo nossas células sendo cultivadas em meio comum e não formando essas esferas flutuantes, elas expressaram OCT4. Porém o tecido utilizado por estes autores para obtenção das células era adulto, e no caso do presente trabalho era fetal. Yu et al. (2006) também encontraram células positivas para OCT4 na pele, localizadas nos folículos pilosos, na região do “bulge”, ressaltada também pela coloração por queratina 15, no entanto a presença de OCT4 na pele não foi testada no presente trabalho.

CONCLUSÃO

As proteínas utilizadas para marcar as células provenientes da região do “bulge” do folículo piloso, CD34 e CD200, mostraram-se presentes no cultivo celular de fetos e adultos, porém elas não foram encontradas diretamente no tecido. Por citometria de fluxo, baixas porcentagens de populações positivas para estes marcadores foram encontradas, o que sugere que, com o método de cultivo utilizado neste trabalho, a obtenção de células-tronco do “bulge” do folículo piloso é possível, e a futura separação dessas células por citometria de fluxo também. A separação dessas células por FACS, para a obtenção de populações purificadas, e seu posterior cultivo, é necessária para determinar as características celulares como proliferação e diferenciação dessas células. O marcador CD200 nunca tinha sido utilizado antes para marcar células de “bulge” da espécie canina, e este trabalho é o primeiro passo para novas pesquisas que envolvam esse nicho, na espécie canina.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Áureo Evangelista Santana, por conceder o uso do Citômetro de Fluxo do laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, situado na FCAV – UNESP, Jaboticabal, e ao seu orientado Nathan Cruz pelo auxílio na operação do aparelho. À professora Daniele dos Santos Martins, por permitir a utilização do Laboratório de Imuno-histoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE), situado na FZEA – USP, Pirassununga.

REFERÊNCIAS

- Bardin N, Anfosso F, Massé J, Cramer E, Sabatier F, Bivic A L, Sampol J, Dignat-George F, 2001: Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood*, **98**, 3677-3684.
- Blanpain C, Lowry W E, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E, 2004: Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* **118**, 635–648.
- Blanpain C, Fuchs E, 2006: Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 339–73.

- Capela A, Temple S, 2002: LeX/SSEA-1 Is Expressed by Adult Mouse CNS Stem Cells, Identifying Them as Nonependymal. *Neuron* **35**, 865–875.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park T S, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P, Traas J, Schugar R, Deasy B M, Badylak S, Buhning H, Giacobino J, Lazzari L, Huard J, Peault B, 2008: A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313.
- Cotsarelis G, Sun T, Lavker R M, 1990: Label-Retaining Cells Reside in the “bulge” Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337.
- Evans H E e Sack W O, 1973: Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat Histol Embryol* **2**, 11–45.
- Gerhards N M, Sayar B S, Origgi F C, Galichet A, Müller E J, Welle M M, Wiener D J, 2016: Stem Cell-Associated Marker Expression in Canine Hair Follicles. *J. Histochem & Cytochem* **64**(3), 190–204.
- Green H, 2008: The birth of therapy with cultured cells. *BioEssays*, **30**, 897–903.
- Inoue K, Aoi1 N, Sato T, Yamauchi Y, Suga H, Eto H, Kato H, Araki J, Yoshimura K, 2009: Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. *Lab Invest* **89**, 844–856.
- Kloepper J E, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt D P, Meyer, Faessler R, R Paus, 2008: Immunophenotyping of the human “bulge” region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol* **17**, 592–609.
- Kobayashi T, Shimizu A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Ohyama M, 2009: Canine hair-follicle keratinocytes enriched with “bulge” cells have the highly proliferative characteristic of stem cells. *Vet Dermatol* **20**, 338–346.
- Kobayashi T, Iwasaki T, Amagai M, Ohyama M, 2010: Canine Follicle Stem Cell Candidates Reside in the “bulge” and Share Characteristic Features with Human “bulge” Cells. *J Invest Dermatol* **130**, 1988–1995.
- Lavker R M, Sun T, 2000: Epidermal stem cells: Properties, markers, and location. *PNAS* **97**, 13473–13475.

- Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken J B, Olsen B R, 2003: Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *Journal of Pathology*, 201, 296–302.
- Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder D E, Albelda S, Cotsarelis G, 1998: The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* **111**, 3179-3188.
- Meirelles L S, Chagastelles P C, Nardi N B, 2006: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues *J Cell Sci* **119**, 2204-2213.
- Morris R J, Potten C S, 1999: Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol* **112**, 470-475.
- Morris R J, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin J S, Sawicki J A, Cotsarelis G, 2004: Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 411-417.
- Najafzadeh N, Sagha M, Tajaddod S H, Golmohammadi M G, Oskoui N M, Moghaddam M D, 2015: *In vitro* neural differentiation of CD34+ stem cell populations in hair follicles by three different neural induction protocols. *In Vitro Cell Dev Biol* **51**, 192–203.
- Ohyama M, Terunuma A, Tock C L, Radonovich M F, Pise-Masison C A, Hopping S B, Brady J N, Udey M C, Vogel J C, 2006: Characterization and isolation of stem cell–enriched human hair follicle “bulge” cells. *J Clin Invest* **116**, 249-260.
- Pascucci L, Mercati F, Gargiulo A M, Pedini V, Sorbolini S, Ceccarelli P, 2006: CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmus region of canine hair follicles. *Vet Dermatol* **17**, 244–251.
- Poblet E, Jimenez F, Godinez J M, Pascual-Martin A, Izeta A, 2006: The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the “bulge” marker CK15. *Clin Exp Dermatol* **31**, 807–812.
- Poblet E, Jiménez F, 2008: CD10 and CD34 in fetal and adult human hair follicles: dynamic changes in their immunohistochemical expression during embryogenesis and hair cycling. *Brit J Dermatol* **159**, 646–652.

- Rosenblum M D, Olasz E, Woodliff J E, Johnson B D, Konkol M C, Gerber K A, Orentas R J, Sandford G, Truitt R L, 2004: CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* **103**, 2691-2698.
- Ruetze M, Knauer T, Gallinat S, Wenck H, Achterberg V, Maerz A, Deppert W, Knott A, 2013: A novel niche for skin derived precursors in non-follicular skin. *Journal of Dermatological Science*, **69**, 132–139.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuju N, Tada T, 2001: Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Current Biology* **11**, 1553-1558.
- Tan K K B, Salgado G, Connolly J E, Chan K Y, Lane E B, 2014: Characterization of Fetal Keratinocytes, Showing Enhanced Stem Cell-Like Properties: A Potential Source of Cells for Skin Reconstruction. *Stem Cell Reports* **3**, 324–338.
- Taylor G, Lehrer M S, Jensen P J, Sun T, Lavker R M, 2000: Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* **102**, 451–461.
- Trempeus C S, Morris R J, Bortner C D, Cotsarelis G, Faircloth R S, Reece J M, Tennant R W, 2003: Enrichment for Living Murine Keratinocytes from the Hair Follicle “bulge” with the Cell Surface Marker CD34. *J Invest Dermatol* **120**, 501-511.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry W E, Rendl M, Fuchs E, 2004: Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* **303**, 359-363.
- Tumbar T, Fuchs E, 2014: Epithelial Skin Stem Cells. In: Lanza R, Atala A (3ed) *Essentials of Stem Cell Biology*. Elsevier San Diego, pp. 203-218.
- Wang Z, Yan X, 2013: CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett* **330**, 150–162.
- Yu K, Chena Z, Gorczynski R, 2013 Effect of CD200 and CD200R1 expression within tissue grafts on increased graft survival in allogeneic recipients. *Immunol Lett*, **149** 1– 8.
- Yu H, Fang D, Kumar S M, Li L, Nguyen T K, Acs G, Herlyn M, Xu X, 2006: Isolation of a Novel Population of Multipotent Adult Stem Cells from Human Hair Follicles. *Am Jour Patholo*, **168**, 1879-1888.
- Zhang Y, Xiang M, Wang Y, Yan J, Zengb Y, Yu J, Yang T, 2006: “bulge” cells of human hair follicles: segregation, cultivation and properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* **47**, 50–56.

ANEXO 1 – Termo de compromisso assinado pelos proprietários

Jaboticabal, ____ de _____ de _____.

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, _____, RG _____, CPF

_____, responsável pelo paciente _____, raça

_____, de _____ anos de idade, estou ciente de que o mesmo está participando

do Projeto de Pesquisa, no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP/Jaboticabal, que tem como responsável o Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e

como equipe a pós graduanda Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro, a qual poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone (16) 3209 2633.

Declaro, também, estar ciente de que um fragmento de pele será retirado do animal durante o procedimento cirúrgico _____ e que este fragmento

será utilizado para obtenção de células-tronco, às quais serão também congeladas e armazenadas, após a utilização para a realização do experimento de pesquisa, para possível posterior utilização.

Responsável