

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/06/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

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

JOÃO PEDRO MARMOL DE OLIVEIRA

Botucatu – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

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

JOÃO PEDRO MARMOL DE OLIVEIRA

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

Orientador: Prof. Associado Rogério Martins Amorim

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

Oliveira, João Pedro Marmol de.

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

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

Orientador: Rogério Martins Amorim
Capes: 50501062

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

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

Nome do autor: João Pedro Marmol de Oliveira

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof^a. Dr^a. Daniele dos Santos Martins

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA – USP – Pirassununga, São Paulo.

Data da defesa: 20 de junho 2023.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A todos, muito obrigado!

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE ABREVIações

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

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

CD – *Cluster of differentiation* – Cluster de diferenciação

cDNA – *complementary deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico complementar

COL1A1 – Colágeno tipo I alfa 1

COL3A1 – Colágeno tipo III alfa 1

CTM – Células tronco mesenquimais

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

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

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

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

g – Força *g*

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

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

MO – Medula óssea

oCTM-TA – Células tronco mesenquimais ovinas de tecido adiposo

P1, 2 e 3 – Passagem celular 1, 2 e 3

RNA – *ribonucleic acid* - ácido ribonucleico

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

SFB – Soro fetal bovino

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SP – Sangue periférico

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

Financiamento

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO GERAL

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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