

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/01/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

BOTUCATU - SP

JANEIRO de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

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

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

Botucatu
Janeiro de 2020

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

Cunha Neto, Campo Amor Vieira da.

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

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

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Coorientador: Peres Ramos Badial

Capes: 50501062

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

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

Nome do autor: Campo Amor Vieira da Cunha Neto

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Membro

Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP – BOTUCATU.

Prof. Luiz Cláudio Nogueira Mendes

Membro

Departamento: Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba.

Prof. Diego José Zanzarini Delfiol

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV da Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Uberlândia, MG.

Data da defesa: 21 de janeiro de 2020.

A Família!

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

São Beda (672-735 d.C.)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Visão geral de 23 Metaloproteinases de Matriz (MMP) identificadas em humanos e seus respectivos nomes comuns. Adaptado de Klein & Bischoff (2011).	14
Tabela 2. Sequência dos conjuntos de primers dos genes alvo (MMP1, MMP8 e MMP13 equino) e endógenos (β -actina e GAPDH equina) utilizados na reação de qPCR. O número de acesso corresponde a sequência do RNAm para os respectivos genes no banco de dados do NCBI.....	26
Tabela 3. Valores de Slope, coeficiente de correlação (R^2) e eficiência de reação para cada um dos genes alvo e endógenos.....	34
Tabela 4. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	39
Tabela 5. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	39
Tabela 6. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	40
Tabela 7. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	40
Tabela 8. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média de dorso foi	

considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.	42
Tabela 9. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.	43
Tabela 10. Expressão gênica de MMP1 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.	45
Tabela 11. Expressão gênica de MMP1 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.	46
Tabela 12. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	48
Tabela 13. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	49
Tabela 14. Expressão gênica de MMP8 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	49
Tabela 15. Expressão gênica de MMP8 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão	

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 22. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	58
Tabela 23. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão de M0 foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e todos os demais foram calculados proporcionalmente.	59
Tabela 24. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GA, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.	60
Tabela 25. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso e ventre do GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média de dorso foi considerada como controle e recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente.	61
Tabela 26. Expressão gênica de MMP13 das amostras de dorso do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.	63
Tabela 27. Expressão gênica de MMP13 das amostras de ventre do GA e GC, ao longo do período experimental. Na parte superior da tabela estão descritos os valores individuais e abaixo estão as médias $\pm$ desvios padrão (DP) da expressão relativa calculada pela equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, segundo LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão média do GC recebeu o valor relativo de 1,0 e a do ventre calculada proporcionalmente, em cada momento.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais passos pós-traducionais na síntese de colágeno (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004).	5
Figura 2. Componentes do espectro eletromagnético da radiação solar total, com potencial de energia e capacidade de penetração na pele humana. Adaptado de: Wang et al. (2019).	16
Figura 3. Desenho experimental demonstrando os pontos determinados para realização das biópsias em cada momento (0 a 5, no dorso e ventre de cada animal), o esquema de restrição e exposição à radiação solar que os grupos de animais foram submetidos, além do esquema de procedimentos para as análises em laboratório.	21
Figura 4. Desenho esquemático demonstrando a posição dos conjuntos de primers e seus respectivos produtos amplificados em relação ao gene (vermelho) e a posição das junções exon-exon (degraus em preto). Primers são representados pelas setas azuis e entre cada seta os produtos amplificados.	25
Figura 5. Baías de experimentação durante a fase de restrição à luz solar. Em A e B um animal controle e um afetado, respectivamente, em C termômetro demonstrando temperatura dentro do conjunto de baías de experimentação, em D aferição da radiação solar.	31
Figura 6. Aferição da radiação solar na região de dorso (A) e ventre (B) de um equino afetado por HERDA, a direção da fotocélula do equipamento está indicada nas setas brancas. Notar, nas imagens de zoom do equipamento, a diferença de aproximadamente oito vezes entre a incidência de radiação solar na região dorsal e ventral de um equino adulto.	31
Figura 7. Boxplots demonstrando as diferenças entre exposição solar da região dorsal e ventral do GA e GC em M3 e M4. Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).	32
Figura 8. Boxplot demonstrando a variação da concentração de RNA total bem como a pureza pela análise da absorbância relativa das amostras de pele de equinos do grupo afetado (GA) e grupo controle (GC).	33
Figura 9. Eletroferograma demonstrando integridade do RNA da amostra padrão pelo RNA Integrity Number (RIM) realizado no equipamento de eletroforese capilar 2100 Bioanalyzer.	33
Figura 10. Gráficos demonstrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de amplificação das diluições seriadas. Em A, B gráficos são referentes aos genes alvos MMP1 e MMP8, respectivamente.	35
Figura 11. Gráficos demonstrando, as curvas padrão com a eficiência de reação, curvas de dissociação (especificidade) e as curvas de	

amplificação das diluições seriadas. Em A e B os gráficos são referentes aos genes alvo MMP13 e endógeno β -actina, respectivamente.	36
Figura 12. Boxplots demonstrando medidas de tendência central e dispersão dos coeficientes de variação dos Cts entre os momentos experimentais dos genes endógenos β -actina e GAPDH, sem diferença estatística ($P>0,05$).....	37
Figura 13. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas ($P<0,05$).....	41
Figura 14. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre dorso e ventre ao longo do período experimental, sendo que em cada momento, as amostras de dorso foram consideradas controles e as de ventre calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre regiões no mesmo momento ($P<0,05$).....	44
Figura 15. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP1 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Asterisco em cima dos diagramas demonstram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) ($P<0,05$).....	47
Figura 16. Boxplots demonstrando a variação na expressão gênica relativa de MMP8 na pele das regiões de dorso (A, C) e de ventre (B, D) de equinos dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Letras diferentes acima dos diagramas indicam diferenças estatísticas ($P<0,05$).	50
Figura 17. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 sem diferenças estatísticas entre dorso e ventre dos grupos de animais afetados (A) e controle normais (B).	53
Figura 18. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP8 e a comparação entre os grupos, ao longo do período experimental. Em cada momento, as amostras do GC receberam o valor relativo de 1,0 e as de ventre foram calculadas proporcionalmente. Não houveram diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento, tanto na região dorsal (A) quanto na região ventral (B) ($P>0,05$).	56
Figura 19. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso (A, C) e ventre (B, D) dos grupos GA (A, B) e GC (C, D). Não houveram diferenças significativas entre os momentos avaliados ($P>0,05$) em nenhuma das regiões de ambos os grupos.	59
Figura 20. Boxplots demonstrando a variação da expressão gênica da MMP13 nas amostras de dorso e ventre do GA (A) e GC (B). não houveram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos estudados ($P>0,05$).....	62

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

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Estrutura, biossíntese e metabolismo do colágeno	5
2.2 Doenças genéticas do colágeno	7
2.3 Astenia cutânea regional hereditária em equinos (HERDA)	8
2.3.1 Etiopatogenia	9
2.3.2 Sinais clínicos e diagnóstico	10
2.3.3 Tratamento, prognóstico e manejo	12
2.4 Metaloproteinases de matriz (MMP)	13
2.5 Ação da radiação solar na matriz extracelular cutânea	15
2.5 Justificativa	18
3. OBJETIVO	18
3.1 Objetivos específicos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais	19
4.2 Delineamento experimental	19
4.3 Colheita das amostras	20
4.3.1 Biópsias de pele	20
4.4 Análise da expressão gênica das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real (qPCR)	22
4.4.1 Extração e purificação de RNA total	22
4.4.2 Reação da Transcriptase Reversa e produção de cDNA	24
4.4.3 Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>)	24

4.4.4 Avaliação dos conjuntos de <i>primers</i> por PCR convencional e sequenciamento Sanger.....	26
4.4.5 Análise especificidade e concentração dos <i>primers</i> e eficiência da reação qPCR	27
4.4.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	28
4.5 Análise estatística	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Tratamento dos grupos: restrição e exposição à radiação solar.....	29
5.2 Análise da expressão gênica pela técnica de qPCR	32
5.2.1 Concentração e qualidade do RNA total das amostras.....	32
5.2.2 Curvas padrão e análise da eficiência da reação de qPCR e análise de variação do gene endógeno utilizado como normalizador	34
5.3 Expressão gênica relativa das Metaloproteinases MMP1, MMP8 e MMP13 da pele de dorso e ventre de equinos afetados (HERDA) e normais.....	37
5.3.1 MMP1.....	38
5.3.2 MMP8.....	48
5.3.3 MMP13.....	57
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS	71
9 ARTIGO CIENTÍFICO	82
10 ANEXOS	104
ANEXO 1 - Normas da Revista Veterinary Dermatology.....	104

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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