

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

TATIANE DA SILVA POLÓ

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE
AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE
EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA
10%

ARAÇATUBA

2022

TATIANE DA SILVA POLÓ

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE
AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE
EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA
10%**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como partados requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Flavia de Almeida Lucas

ARAÇATUBA

2022

P778a Poló, Tatiane da Silva
Análise da expressão de mRNA de amostras FFPE de
feridas lombares de equinos tratados com óleo de
copaíba 10% / Tatiane da Silva Poló. -- Araçatuba, 2022
53 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flavia de Almeida Lucas

1. Cavalo. 2. Fitoterapia. 3. Transcriptoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA 10%

AUTORA: TATIANE DA SILVA POLÓ

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)

Faculdade Multivix - Campus Nova Venécia

Araçatuba, 10 de fevereiro de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA 10%

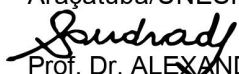
AUTORA: TATIANE DA SILVA POLÓ

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP



Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)

Faculdade Multivix - Campus Nova Venécia

Araçatuba, 10 de fevereiro de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA 10%

AUTORA: TATIANE DA SILVA POLÓ

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)

Faculdade Multivix - Campus Nova Venécia

Araçatuba, 10 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA 10%

AUTORA: TATIANE DA SILVA POLÓ

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)
Faculdade Multivix - Campus Nova Venécia

Araçatuba, 10 de fevereiro de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE AMOSTRAS FFPE DE FERIDAS LOMBARES DE EQUINOS TRATADOS COM ÓLEO DE COPAÍBA 10%

AUTORA: TATIANE DA SILVA POLÓ

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI (Participação Virtual)

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

A blue ink signature of Helena Cristina Delgado Brito is written above the name of the fourth professor.

Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)

Faculdade Multivix - Campus Nova Venécia

Araçatuba, 10 de fevereiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico...

À minha mãe Celeste que sempre me ajudou a acreditar em mim mesma. Sempre lutou ao meu lado em cada conquista. Sem você eu não estaria aqui hoje.

Ao meu pai Jaime por ser meu grande amigo, e sempre me lembrar que sou amada, melhorando minha autoestima. Te amo para sempre.

Ao meu filho Paulo, a melhor parte mim, a pessoa que me faz todos os dias levantar e querer viver. Meu amor infinito. Espero que seja muito realizado pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu irmão Vinícius e minha irmã Viviane, por serem meus melhores amigos e, mesmo após discussões, sempre estavam ao meu lado.

Ao meu marido Marcelo por nunca soltar a minha mão, seja momentos bons ou ruins, seguindo firme ao meu lado. Espero que continuemos a evoluir juntos.

Aos meus gatos Sansa, Cat, Miguel, Ragnar, Claire, Gaia, Nino, Chico, Tom, Anne, Gabriel, Lince, Cratos. Vocês me dão todo o seu amor e sou muito grata.

Aos meus cães Tobias, Lily e Dinho. Vocês sempre conseguem me arrancar um sorriso.

Aos animais que fizeram parte desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Gratidão...

À Deus, meu guia, minha força agradeço por me fortalecer durante esta jornada me mantendo firme neste caminho.

Aos meus pais Celeste e Jaime, pelo amor, orientação, carinho e compreensão. Vocês são meus portos seguros.

Aos meus irmãos, por serem meus melhores amigos e me fornecerem o privilégio de ser tia de crianças maravilhosas: José, Cecília e Nicolas.

Ao meu filho, por ser o anjo que veio para me salvar. Todos os dias você me faz mais perseverante.

Ao meu marido Marcelo, pelo companheirismo, por estar ao meu lado em todos os momentos. Gratidão por sempre me ensinar a confiar mais em mim

À minha orientadora professora Flavia de Almeida Lucas, por ter aceitado o desafio de me orientar em tão pouco tempo, me auxiliando de forma excepcional, com muita paciência. Gratidão eterna por me amparar.

À professora Juliana Regina Peiró, por me acompanhar durante toda a minha jornada desde a graduação, me fazendo crescer profissional e pessoalmente. Gratidão por sempre acreditar em mim.

À minha amiga terapeuta holística Najla, que me auxilia a reconectar com as energias do universo e, assim, conseguir me manter firme, confiante e em equilíbrio. Gratidão por me ajudar a me conhecer melhor cada vez mais.

Aos poucos amigos que tenho, mas, apesar da distância, saibam que podem contar comigo.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP), pelo financiamento do projeto nº 2018/03151-0, do qual esta pesquisa faz parte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

CAPES, por ter fornecido bolsa durante a realização do meu doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlia de Mesquita Filho”, principalmente à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba por ser eternamente a minha casa.

À toda equipe que desenvolveu este projeto, possibilitando finalizar esta etapa tão importante na minha vida. Gratidão por cada um que participou do seu desenvolvimento.

Gratidão eterna.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo, saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”*

Ana Vilela – Trem Bala (canção)

POLÓ, T.S. **Análise da expressão de mRNA de amostras FFPE de feridas lombares de equinos tratados com óleo de copaíba 10%**. 2022. 55f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi analisar o transcriptoma de mRNA de feridas cutâneas experimentais na região lombar de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba a 10% a partir de biopsia de amostras, fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). Foram utilizadas biopsias de feridas experimentais em região lombar de equinos tratadas ou não (controle) com óleo de copaíba a 10% obtidas e armazenadas em FFPE há sete anos. A extração do RNA foi realizada utilizando *Kit Qiagen RNeasy FFPE*, devidamente quantificado e qualificado para análise da expressão do transcriptoma no GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip, escaneadas pelo GeneAtlas (Affymetrix®), utilizando o software *Transcriptome Analysis Console* (TAC) (Affymetrix®) para identificação, empregando-se a análise estatística ANOVA (*fold change* $\pm 1,5$; FDR corrigido $P < 0,05$). A metodologia de extração de mRNA mostrou-se eficaz na avaliação de amostras de tecido tegumentar FFPE para realização de transcriptoma. O grupo que recebeu o óleo de copaíba a 10% apresentou cinco mRNA supra regulados, relacionados aos genes MIR365-2, MIR551B, LOC100060487, RPL12 e CNN3, além de três mRNA infra regulados, estes relacionados aos genes LOC102149005, LOC102149966 e C10H19orf33. Este é o primeiro estudo relacionado ao transcriptoma de mRNA de feridas lombares em equinos tratados com óleo de copaíba 10%. Os cinco genes supra regulados estão relacionados ao controle de tecido de granulação, apoptose e migração fibroblástica e, entre os três genes infra regulados, há o envolvimento da proteína ligadora de histonas, que ao ser inibida há diminuição da fibrose em pele, melhorando as características de cicatrização feridas ferida.

Palavras-chave: Cavalo. Fitoterapia. Transcriptoma.

POLÓ, T.S. **Analysis in mRNA expression of FFPE sample from equine lumbar wounds treated with 10% copaíba oil.** 2022. 55f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

The objective of this research was to analyze the mRNA transcriptome of experimental cutaneous wounds in the lumbar region of horses treated or not with 10% copaiba oil from biopsy samples, fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). Were used biopsies of experimental skin wounds in the lumbar region of horses treated or not (control) with 10% copaiba oil, fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE), obtained and stored seven years ago. The RNA extraction was performed Quiagen RNeasy FFPE kit, properly quantified and qualified for analysis of transcriptome expression in the GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip, scanned by GeneAtlas (Affymetrix®), and genes identified by Transcriptome Analysis Console (TAC) (Affymetrix® software), using the statistical analysis ANOVA (fold change ± 1.5 ; FDR corrected $p < 0.05$). The mRNA extraction methodology was favorable in the evaluation of FFPE samples for transcriptome performance. Comparing the groups, 10% copaiba oil showed increased expression of five mRNAs related to genes MIR365-2, MIR551B, LOC100060487, RPL12 and CNN3, and decreased expression of three mRNAs related to genes LOC102149005, LOC102149966 and C10H19orf33. This is the first study related to mRNA transcriptome from lumbar wounds in horses treated with 10% copaiba oil of healing wounds. The five genes upregulated are related to the control of granulation tissue, apoptosis and fibroblast migration and, among the three downregulated genes, there is the involvement of the histone-binding protein, which, when inhibited, reduces fibrosis in the skin, improving the characteristics of the skin.

Keywords: Horses. Phytotherapy. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem fotográfica do GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip (A) e GeneAtlas (Affymetrix®). 27

Figura 2 - *Volcano plot* (Valor de P x *Fold change*) da expressão dos mRNA quando comparados os grupos tratamento e controle das feridas lombares. Os pontos vermelhos representam graficamente os mRNA supra regulados no grupo tratamento e os pontos verdes representam graficamente os mRNA infra regulados no grupo tratamento, diferencialmente expressos no grupo tratamento. 29

Figura 3 - Mapa de calor da expressão dos mRNA, quando comparados os grupos tratamento e controle de feridas lombares. As lacunas vermelhas representam os genes que estão up-regulados no grupo tratamento, e as lacunas azuis representam os genes que estão down-regulados no grupo tratamento. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio-padrão, *fold change* e valor de P dos mRNA diferencialmente expressos, quando comparadas as feridas lombares que receberam o óleo de copaíba a 10% e o grupo controle

28

LISTA DE ABREVIATURAS

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
FFPE	Fixadas em formalina e embebidas em parafina
RNA	Ácido ribonucleico
Mm	Milímetro
MHCI	Complexo Principal de Histocompatibilidade I
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade II
MEC	Matriz extracelular
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF β -1	Fator de crescimento transformados beta 1
MMP	Matriz metaloproteinase
TIM	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TGE	Tecido de granulação exuberante
FDA	Food and Drug Administration
pl3K	Fosfoinosítido 3-quinase
Akt	Proteína quinase B
mTOR	Proteína alvo da Rapamicina
MPAK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
JAK/STAT	Transdutor do Quinase-Sinal de Janus e activador da transcrição
CB2	Receptor endocanabinoide tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Mg	Miligrama
Kg	Kilograma
RNAse	Ribonuclease
μ m	Micrômetro
mL	Mililitro
Rpm	Rotações por minuto
DNAse	Desoxirribonuclease
μ g	Micrograma
Fc	Fator de conversão

Fd	Fator de diluição
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
μL	Microlitro
miRNA	MicroRNA
TAC	Transcriptome Analysis Console
RMA	Robust Multi-array Average
ANOVA	Análise de variância
HPV	Papiloma vírus humano
BCL2	Gene B-cell lymphoma protein 2
BAX	Bcl-2 associated protein X
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
UTR	Região Não Traduzida
HB-EGF	Fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
NTD	Domínio N-terminal
CTD	Domínio C-terminal
RPs	Proteínas ribossomais
p53	Proteína p53
ERK ½	Quinase regulada pela sinalização extracelular
α-SMA	α-actina de músculo liso
ACADSB	Acil-coA desidrogenase de cadeia curta e ramificada
IMUP	Immortalization up-regulated protein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A pele equina e seu processo de reparação	20
2.2 O óleo de copaíba	24
2.3 A tecnologia do Microarranjo	26
3 OBJETIVO	30
3.1 Hipóteses	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Extração de RNA	32
4.3 Análise do mRNA	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

Devido à natureza do equino e ao ambiente em que vivem, as feridas traumáticas são relativamente comuns nestes pacientes (HENDRIX; BAXTER, 2005). Quando não manejadas adequadamente ocorrem complicações levando à formação do tecido de granulação exuberante, prejudicando a cicatrização (CASTON, 2012). As mesmas dificuldades do processo cicatricial com desenvolvimento de feridas crônicas e distúrbios fibroproliferativos são observadas em humanos, desenvolvendo o queloide. Em ambos é observada a superprodução de matriz extracelular por fibroblastos sintéticos que favorecem a deposição de colágeno, retardando a diferenciação em fibrócitos quiescentes ou a apoptose (THEORET *et al.*, 2013), podendo ser o equino um modelo experimental para as feridas complicadas em humanos.

O óleo de copaíba é extraído da copaibeira que o tem como produto de excreção e desintoxicação, com função de defesa contra animais, fungos e bactérias (SILVA *et al.*, 2015), sendo popularmente usada pelos seus efeitos terapêuticos, entre elas: atividade antibacterianas, antiparasitária, antineoplásica e anti-inflamatória (DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018). É composto por sesquiterpenos e diterpenos, utilizados em diferentes concentrações, por via oral ou tópica, para controle de dores neuropáticas (URASAKI; BEAUMONT; WORKMAN; *et al.*, 2020), modulação da resposta inflamatória crônica (TEIXEIRA *et al.*, 2017), ativação das vias de sinalização apoptóticas (URASAKI; BEAUMONT; TALBOT; *et al.*, 2020), diminuindo aderências abdominais (YASOJIMA *et al.*, 2013), além de ser eficiente no tratamento de mastite (OLIVEIRA *et al.*, 2020), possuir efeito antiparasitário contra a leishmania (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017), auxiliar na cicatrização de tecido ósseo (SILVA *et al.*, 2015), feridas na cavidade oral (TEIXEIRA *et al.*, 2017), cistotomia (FEITOSA *et al.*, 2018), melhorando os aspectos macroscópicos das feridas em equinos (LUCAS *et al.*, 2017).

Pesquisas de expressão gênica compreende em detectar e quantificar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de um gene, compreendendo sua função. Dentre as técnicas disponíveis para análise do transcriptoma, atualmente as mais utilizadas são qPCR, microarrays de expressão e RNAseq para a análise do transcriptoma (SEGUNDO-VAL; SANZ-LOZANO, 2016).

A tecnologia de microarranjo produz informações importantes sobre o transcriptoma, sendo uma das principais ferramentas na expressão gênica (MALONE; OLIVER, 2011) para o fornecimento de informações sobre a regulação e função dos reguladores transcricionais no reparo de feridas (SCHAFER; WERNER, 2007). Na rotina da patologia é comum os materiais de biópsias serem fixados em formalina 10% e embebidos em parafina, disponíveis amplamente para estudos retrospectivos (BELDER *et al.*, 2016), sendo relevante a possibilidade da extração do RNA dessas amostras para análises de expressão (BOOS *et al.*, 2019).

Sendo assim, é inegável a importância do tema apresentado aliada à possibilidade de se utilizar blocos parafinizados para extração de RNA na determinação das vias biológicas envolvidas na cicatrização de feridas em equinos. Portanto, reconhece-se que se trata de assunto que merece novas e originais investigações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A pele equina e seu processo de cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo, recobrando toda a superfície externa e é composta por três camadas: epiderme, a derme e a hipoderme (SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021). Funciona como uma barreira primária do corpo atuando como proteção contra perda de água e penetração de compostos. É um órgão imunológico linfóide periférico que ainda fornece percepção sensorial, regulação de temperatura e barreira fotoprotetora através da pigmentação (LINDGREN *et al.*, 2020; MATEJUK, 2018; SCOTT, 1988; TALUKDAR; CALHOUN; STINSON, 1972).

A epiderme é dividida em camadas chamadas de estratos, sendo basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. Os humanos possuem quatro a cinco camadas de epiderme e os equinos possuem cinco a sete camadas de células (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021) que variam a espessura de acordo com a região, sendo o corpo em geral 53mm e regiões como testa, região dorsal do pescoço e tórax, garupa e base da cauda, chegando até a 91mm (EGAWA; KABASHIMA, 2011; LINDGREN *et al.*, 2020; SCOTT, 1988). O estrato basal ou germinativo, repousa sob a lâmina basal, sendo a camada mais profunda constituída por uma camada única de células cúbicas a cilíndricas, onde se encontram as células-tronco ativas produzindo constantemente queratinócitos. Logo acima há o estrato espinhoso (células espinhosas) que contém células poligonais cubóides ou achatadas, com núcleo central e pouco citoplasma, ligadas com células vizinhas por desmossomos, que auxiliam na junção entre células, também encontrando células dendríticas. O estrato granuloso é uma fina camada formada por células achatadas rombóides ou pavimentosas, onde se encontram os grânulos de queratohialina, com precursores de queratina, e grânulos lamelares, com os glicolipídicos que são secretados na superfície celular agindo como uma cola entre as células. O estrato lúcido encontra-se nas regiões desprovidas de pelo, formado por células pavimentosas, homogêneas, translúcidas e anucleadas, composta de eleidina, um produto de transformação queratohialina. O estrato córneo é a camada mais superior, composta por queratina e escamas córneas compostas de queratinócitos mortos que secretam defensinas, que fazem parte da primeira defesa imunológica

(FARIA, 2009; SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021).

Há quatro tipos de células distintas na epiderme. Predominam os queratinócitos, que são originados na camada basal, migrando constantemente para formar os diferentes estratos epidérmicos produzindo a queratina, além de ser responsáveis pela barreira hídrica através da produção e secreção de lipídios (FARIA, 2009; SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021). Derivado das células da crista neural, os melanócitos são responsáveis pela pigmentação, produzindo a melanina, encontrados entre as células do estrato basal. Também há as células de Langerhans, de origem mesenquimal, encontradas principalmente no estrato espinhoso, que expressam moléculas de MHC I e MHCII capazes de captar antígenos da pele e transportar até o linfonodo. No estrato basal há as células de Merkel que desempenham uma função sensorial (SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021).

A derme é composta principalmente de tecido conjuntivo que compõe uma malha interligada de fibras de elastina e colágeno, produzidas pelos fibroblastos, o que lhe garante força e elasticidade, além de possuir quantidades variadas de fibroblastos, dendrócitos dérmicos e mastócitos (LINDGREN *et al.*, 2020; SCOTT, 1988; TALUKDAR; CALHOUN; STINSON, 1972), abrigando glândulas sudoríparas, músculo, neurônios sensoriais, vasos e folículos pilosos (SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021), apresentando mais esparsos nos humanos, e densamente distribuídos em equinos (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021).

A hipoderme também é chamada de fáscia subcutânea, sendo a camada mais profunda da pele, abaixo da derme, consistindo basicamente em tecido adiposo e conjuntivo além de alguns apêndices da pele, como folículos pilosos, neurônios sensoriais e vasos sanguíneos (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021; SHARMA; MANDY; SANDEEP, 2021). Humanos e equinos possuem *panniculus carnosus* rompido, que consiste numa camada de músculo estriado abaixo da hipoderme (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021) fazendo com que o processo de cicatrização seja mais pela epitelização, diferente das espécies que o possuem integralmente, apresentando um processo de cicatrização por contração (THEORET; WILMINK, 2013).

Devido à natureza do equino e do ambiente em que vivem, é comum acontecer acidentes que envolvam traumas originando feridas. O tratamento dessas feridas é um desafio pois não há uma receita pronta que facilite a cura, sendo

essencial um profissional que entenda o processo de cicatrização e o que fazer para auxiliar em cada fase (CASTON, 2012) além de exercerem um impacto financeiro significativo na indústria equina (THEORET *et al.*, 2013).

Apesar de ser a melhor opção, na maioria das vezes o fechamento por primeira intenção é malsucedido decorrente da perda maciça de tecido, tensão excessiva da pele, contaminação local ou longo tempo do ocorrido (THEORET *et al.*, 2013). Na reparação por segunda intenção, que acontece por granulação, o seu gerenciamento é o maior desafio, podendo se tornar exuberante (DAHLGREN, 2018), um distúrbio fibroproliferativo semelhante ao quelóide humano (MIRAGLIOTTA *et al.*, 2008), sendo que a complexidade do processo de cicatrização contribui para as dificuldades na elaboração de protocolos de tratamentos (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021).

A cicatrização normalmente é dividida em quatro fases: hemostasia, inflamação/desbridamento, proliferação e maturação/remodelação. Elas se sobrepõem e variam a duração e intensidade de acordo com a espécie, anatomia, localização e tamanho da ferida (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021) sendo que qualquer situação que prolongue ou impeça a conclusão de uma dessas fases, prejudica o processo como um todo (CASTON, 2012).

A hemostasia é uma resposta imediata à lesão ocasionando vasoconstricção e coagulação, com o objetivo de cessar a perda de sangue e concentrar fatores de crescimento que contribuem para a cicatrização de feridas (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021). Há deposição de plaquetas formando um trombo rico em plaquetas (trombo branco) que se transforma em trombo fibrinoso após infiltração de fibrina, realizando captura de eritrócitos originando o trombo vermelho, responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido (REINKE; SORG, 2012). O coágulo que se forma preenche a ferida funcionando como uma barreira contra patógenos invasores impedindo, também, o ressecamento da ferida. Também funciona como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento, servindo como uma matriz provisória (HAERTEL; WERNER; SCHAFER, 2014).

A fase inflamatória ou de desbridamento é ativado durante a hemostasia e coagulação e tem como característica a infiltração de células imunes a fim de controlar contaminação secretando citosinas e fatores de crescimento que induzem a fase seguinte, proliferação. Inicia com o recrutamento de neutrófilos, essenciais

nos primeiros dias pela capacidade de fagocitose e secreção de protease, eliminando bactéria e degradando tecido necrótico (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021; REINKE; SORG, 2012).

A transição da fase inflamatória para a proliferativa fica demarcada pela transformação dos macrófagos, essencial para o processo de cicatrização. Os macrófagos M1, associados à atividade fagocítica, se transformam no subconjunto M2, envolvidos na síntese de mediadores anti-inflamatórios e na produção de matriz extracelular (MEC), no início da proliferação fibroblástica e processos angiogênicos, além de fagocitar neutrófilos, bactérias e dentritos celulares (SORG *et al.*, 2017). Durante a fase proliferativa há migração celular da margem da ferida com o objetivo de fechamento, ativando vários fatores entre eles o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformados beta 1 ($TGF\beta$ -1), que ativam os fibroblastos dérmicos (ativados também pelo estresse mecânico sob a ferida). Nesta fase proliferativa há formação de tecido de granulação de aspecto granular envolvendo os fibroblastos, proliferando rapidamente (HAERTEL; WERNER; SCHAFER, 2014). Esses fibroblastos iniciam a substituição da matriz provisória criada inicialmente contendo fibrina, fibronectina e hialuronano, por glicoproteínas, proteoglicanos e secretam colágeno e colágeno imaturo (tipo III) e, eventualmente, colágeno maduro (tipo I). Após a deposição dessa matriz, a síntese proteica cessa e os fibroblastos subsequentes sobrem apoptose ou adquirem características de músculo liso, se diferenciando em miofibroblastos, contribuindo para a contração da ferida (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021; THEORET, 2005).

Durante a fase de maturação ou remodelamento é criado um tecido mais organizado pela deposição e degradação das proteínas da MEC (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021). Os proteoglicanos substituem o hialuronano na MEC e o colágeno tipo I fornece gradualmente resistência à tração à ferida. Há liberação de enzimas proteolíticas, entre elas da classe matriz metaloproteinase (MMP), liberadas nas células da ferida, entre eles as collagenases intersticiais, metalogelatinases que degradam os colágenos desnaturados, atacando também as membranas basais, de forma que o equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno durante esta fase de remodelação, depende da participação das MMPs e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIM). Qualquer desequilíbrio proporciona uma resolução anormal da ferida. A remodelação do colágeno se

mantém com a formação de feixes de colágeno maiores, orientados ao longo das linhas de tensão (THEORET, 2005)

A apresentação clínica do TGE é notavelmente similar àquela do queloide humano, porém mais exacerbada. Essas condições compartilham uma série de características fisiopatológicas e histopatológicas (THEORET *et al.*, 2013; THEORET; WILMINK, 2013; UD-DIN; BAYAT, 2014). Em particular, inflamação crônica, angiogênese aberrante e epitelização e contração defeituosas (LEPAULT *et al.*, 2005; UD-DIN; BAYAT, 2014)

Em geral a medicina regenerativa refere-se à criação de tecidos para substituir ou restaurar tecidos nativos ausentes, perdidos ou danificados devido a defeito congênito, envelhecimento, doença ou lesão (DAHLGREN, 2018). Este processo de cicatrização é um desafio para os humanos e equinos, que possuem características anatômicas da pele semelhantes, o que permite que o cavalo seja um modelo ideal para estudo para os humanos. Dentre as diferenças da pele dessas espécies, os humanos são considerados “pele apertada” apresentando subcutâneo bem aderido à pele, enquanto os cavalos apresentam algumas regiões, como tronco, considerados “pele solta” semelhante à roedores (HARMAN; THEORET; VAN DE WALLE, 2021) facilitando o processo de cicatrização.

2.2 O óleo de copaíba

O óleo de copaíba foi descrito pela primeira vez em 1638, sendo aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1972, é extraído de copaibeiras, árvores pertence à família Fabaceae, e subfamília Caesalpinoideae, apresentando crescimento lento e alcançando uma altura de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; G., 2009). Existe mais de 70 espécies distribuídas pelo mundo, sendo o Brasil onde há a maior biodiversidade, característica principalmente da região da Amazônia, no qual é popularmente usada pelos seus efeitos terapêuticos, entre elas atividade antibacterianas, antiparasitária, antineoplásica e anti-inflamatória (DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018).

Em sua forma natural, o óleo da copaibeira é produto de excreção ou desintoxicação com a função de defesa contra animais, fungos e bactérias (SILVA *et al.*, 2015), possuindo diversos componentes na sua composição, entre eles,

hidrocarbonetos sesquiterpênicos, em especial o β -cariofileno, e ácidos diterpênicos, principalmente caurano, lábdano, cleorodano (DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018), incluindo estruturas normalmente encontradas por espectrofotometria, como o ácido copálico, ácido hardwickiico e o ácido carenóico (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; G., 2009). Dentre esses componentes, o β -cariofileno, que, em alguns óleos, constitui mais de 50% do óleo, liga-se seletivamente ao receptor canabinoide 2 (CB2) (GERTSCH *et al.*, 2008), sendo um alvo terapêutico nas dores inflamatórias e neuropáticas (URASAKI; BEAUMONT; WORKMAN; *et al.*, 2020). Em situação com menor concentração deste componente (37%), utilizando-o por via oral, modula a resposta inflamatória crônica, edema e a quantidade de macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

As pesquisas para entender todas as funções deste fitoterápico se estende inclusive para atividades de sinalização neuronal associadas à inflamação e dor neuropático mediada pela regulação da via p13K/Akt/mTOR de Akt3, dominante em tecidos cerebrais, sendo que a sua perda de sua função induz comportamento depressivo, ansiedade, déficit de memória e aprendizagem (URASAKI; BEAUMONT; TALBOT; *et al.*, 2020). Ainda, além dessa via de sinalização ser positivamente, ainda inclui as vias MAPK e JAK/STAT, regulando, portanto, além do metabolismo neuronal, a proliferação e imunidade, mediada em partes pelo CB2, além da ativação da via de sinalização de apoptose tempo dependente (URASAKI; BEAUMONT; WORKMAN; *et al.*, 2020).

Ainda há muitas divergências na literatura quanto aos seus benefícios, sendo importante a realização de pesquisas determinando como exaltar seus benefícios em diversos tratamentos. Silva *et al.* (2015) não encontrou benefícios na cicatrização óssea de mandíbulas de ratos 40 dias após o procedimento, enquanto Silva *et al.* (2013) observou bons resultados com administração tópica e sistêmica em relação a cicatrização de feridas alveolares após exodontia, com aumento de neoformação óssea, porém, ao realizar irrigação alveolar direta no tecido conjuntivo, não obteve uma boa cicatrização, apresentando fibras de tecido conjuntivo desorganizadas. Enquanto sua atividade anti-inflamatória é comparada ao dos anti-inflamatórios esteroidais, reduzindo células inflamatórias acelerando o reparo tecidual, quando utilizado em feridas em cavidade oral (TEIXEIRA *et al.*, 2017), quando aplicado diretamente em sutura de cistotomia em ratos, aumentou a vascularização local aumentando a fase inflamatória, mas sem interferir na fisiologia

do colágeno (FEITOSA *et al.*, 2018).

A metodologia de como o óleo de copaíba é utilizado em diversas situações, também pode alterar a resposta final de sucesso ou insucesso do objetivo proposto. Utilizando-o no tratamento de lesões cirúrgicas em aponeurose muscular de ratos, ao realizar a correção utilizando tela de polipropileno/poliglecaprone sob imersão direta do óleo, a cicatrização da parede abdominal foi prejudicada por apresentar um efeito corrosivo, porém, quando utilizado sob alimentação forçada acelerou o processo de formação de fibras de colágeno sem prejudicar os estágios iniciais da cicatrização, diminuindo a quantidade de aderências abdominais (YASOJIMA *et al.*, 2013). Essas mesmas características, observando um processo de cicatrização mais organizado ocasionando um melhor aspecto macroscópico da ferida, também já foi observado em feridas lombares e metacarpianas em equinos utilizando este fitoterápico quando utilizado na concentração de 10% diretamente sobre a ferida (LUCAS *et al.*, 2017).

Seus efeitos antimicrobianos podem auxiliar no tratamento contra isolados multirresistentes de mastite bubalina (OLIVEIRA *et al.*, 2020), além de melhorar processo de cicatrização em feridas contaminadas com bactérias gram-positivas (MASSON *et al.*, 2013). O óleo e seus terpenos isolados ainda possuem efeito antiparasitário, promissor contra a forma amastigota de leishmaniose, alterando membrana celular e mitocôndrias, com baixa citotoxicidade, auxiliando no processo cicatricial de úlceras cutâneas (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Em condições experimentais, o óleo de copaíba 10% traz benefícios na cicatrização de feridas em equinos (LUCAS *et al.*, 2017), melhorando características de coloração, contorno distorção e textura em diferentes tipos de cicatriz em humanos quando utilizado na forma em gel à base de silicone (WAIBEL *et al.*, 2021) sendo necessárias mais pesquisas para explicar o processo responsável por esses benefícios.

2.3 A tecnologia do microarranjo

O microarranjo, através de hibridização molecular, permite analisar o nível de expressão relativa de um gene, determinando a quantidade de RNA mensageiro (mRNA) presente, sendo possível realizar a análise rápida e eficiente da expressão

de milhares de genes em um único experimento, sendo uma ferramenta muito precisa (BEHZADI; RANJBAR, 2019; CHRISTIE, 2005; GARRIDO; GARCIA-HERRERO; MESEGUER, 2013). Ao detectar sequências de RNA específicas é possível obter os níveis de “expressão gênica” de mRNA transcrito de cada gene no genoma, sendo também possível realizar genotipagem para detectar sequências de DNA específicas permitindo medir a abundância de transcrição (SEGUNDO-VAL; SANZ-LOZANO, 2016; WHITFIELD *et al.*, 2006). Diferentemente do DNA, a transcrição de DNA para RNA é algo breve e específico para tecidos e células dentro dos tecidos, sendo que a expressão gênica é responsiva ao ambiente celular e extracelular (PLOMIN; SCHALKWYK, 2007).

A transcriptômica é o estudo do *pool* de RNA mensageiro expresso em uma célula em um determinado momento sob determinadas condições (GARRIDO; GARCIA-HERRERO; MESEGUER, 2013), de tal forma que essa tecnologia permite realizar medidas simultâneas do nível de RNA mensageiro (mRNA) de milhares de genes, mudando drasticamente o formato das pesquisas (WHITFIELD *et al.*, 2006). Pelo fato do RNA degradar rapidamente, a expressão gênica pode ser indexada pelo número de transcritos de RNA em um determinado tecido, sendo que a tecnologia do microarranjo, permite detectar uma imagens instantânea do perfil de expressão gênica em todo o genoma para diferentes grupos, em especial caso x controle, em momentos e tecidos diferentes (PLOMIN; SCHALKWYK, 2007).

Tem como princípio a hibridização de pares de bases, permitindo detectar sequências específicas, desenvolvido a partir do perfil de uma seleção de genes em um filtro de membrana para todos os transcritos de mRNA simultaneamente, o transcriptoma, em uma superfície sólida, podendo até dezenas de milhares de sequências de DNA únicas (TAO *et al.*, 2017). Com o tempo, essa tecnologia tem expandido sua capacidade de detectar e analisar transcriptomas de mRNAs, permitindo a análise de RNAs não codificantes, como microRNAs e RNAs não codificantes longos (WEAVER; GOPALAKRISHNAN; JOE, 2017).

Uma das aplicações mais comuns da técnica de microarranjo é a determinação do perfil de “expressão diferencial” tendo como objetivo a identificação do mRNAs e genes relacionados, comparando duas condições, a fim de compreender as funções dos genes. Em pesquisas também é possível identificar vias biológicas afetadas pelos níveis de expressão de um determinado gene, bem como sucesso de terapias, abordar questões relacionadas ao fenótipo de uma

doença específica, fornecendo informações referente aos processos biológicos envolvidos, possibilitando identificar biomarcadores para estabelecimento de diagnóstico ou prognóstico (LI, 2012; TAO *et al.*, 2017).

Para a realização da técnica é utilizada uma lâmina de vidro, membrana de *nylon* ou *chip* de silicone contendo sondas de oligonucleotídeos (pequeno fragmento de DNA de fita simples específico para um gene), DNA ou DNA complementar (cDNA) ancoradas de forma organizada em um determinado local (*spots*), de forma que um “alvo” dessa sonda é uma amostra de ácido nucleico livre, ou seja, fragmentos de mRNA complementar das amostras, sendo fragmentos corados com fluorescência para detecção (CHRISTIE, 2005). Posteriormente a imagem é escaneada com ferramentas de análise de imagem interpretando a intensidade e localização dessa fluorescência, relacionando com a expressão de mRNAs individuais, fornecendo, portanto, uma visão global das mudanças nos padrões de expressão gênica em resposta a alterações fisiológicas ou manipulação de reguladores transcricionais. Ainda, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, é possível realizar uma interpretação ontológica dos resultados através do conhecimento molecular atual e bancos de dados, incluindo listas de componentes celulares, processos biológicos, funções moleculares e vias metabólicas que apresentam um número significativo dos genes que os compõem infra ou supra regulados (GARRIDO; GARCIA-HERRERO; MESEGUER, 2013). Dentre as ferramentas visuais úteis há o gráfico de vulcão e o mapa de calor. O gráfico de vulcão exibe os sinais padronizados e não padronizados do nível de ruído relativos à expressão diferencial dos níveis de mRNA, podendo incorporar outras informações como anotação de genes facilitando o processo de geração de hipóteses (LI, 2012).

Dentre as limitações dessa técnica incluem os custos e o acesso, principalmente para tipos de amostras não convencionais (KRIZKOVA *et al.*, 2016), faixa dinâmica de detecção limitada não sendo adequado para estudos com expressão de genes muito baixa ou muito alta, possibilidade de pesquisar apenas sequências genômicas conhecidas sendo que novas transcrições não são detectadas, dificuldade em comparar experimentos com níveis de expressão diferenciadas exigem métodos de normalização complicados para comparação, ocorrência de hibridização cruzada entre genes de sequência semelhantes, e a necessidade de validação (SEGUNDO-VAL; SANZ-LOZANO, 2016).

A possibilidade da produção de quantidade de conjuntos de genes com baixa estimativa de erro, com uma quantidade pequena de amostra obtendo milhares de conjuntos de genes com alta robustez, é uma das principais vantagens desta técnica (DOUGHERTY, 2001). Além disso, atualmente, sua tecnologia ao longo dos anos estabeleceu uma série de medidas de controle de qualidade para melhorar a reprodutibilidade e a precisão dos dados produzidos (MARZANCOLA; SEDIGHI; LI, 2016).

A fixação de rotina em formalina a 10% de biópsias e autópsias ainda é o tipo mais comum de arquivo de amostra em instalações de patologia. A recuperação e amplificação do ácido nucleico do material FFPE é de crescente interesse por estudo piloto e retrospectivo para uma variedade de objetivos (BOOS *et al.*, 2019). Há possibilidade de extração de RNA de amostras FFPE para estudos de expressão gênica, inclusive microarranjo (ABDUEVA *et al.*, 2010; MUSELLA *et al.*, 2015; RIBEIRO-SILVA; GARCIA, 2008).

3 OBJETIVO

Objetivou-se analisar o transcriptoma de mRNA de feridas cutâneas experimentais na região lombar de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba a 10% a partir de biopsia de amostras, fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE).

3.1 Hipóteses

O que nos motivou a intentar essa pesquisa foram aventadas as seguintes hipóteses:

- 1) Se haveria possibilidade de extração de mRNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina para realização de transcriptoma;
- 2) Levantar em conta as informações existentes na literatura, relacionar as características dos mRNA supra e infra regulados no grupo tratado com óleo de copaíba a 10%, para encaminhar futuras pesquisas na área de cicatrização de feridas de equinos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado e conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal sob processo FOA nº 00301-2018.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Endotoxemia e Enfermidades de Grandes Animais (LEEGA) e de Biologia Molecular e Cicatrização (BIOCELL) do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal e Laboratório de Epigenômica do Departamento de Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

4.1 Animais

Mediante pesquisas realizadas anteriormente, foram utilizadas biopsias fixadas em formalina coletadas há sete anos, mantendo-se armazenadas em blocos parafinados. Esse material foi coletado de quatro cavalos sem raça definida, saudáveis, alimentados com ração comercial (1,5% do peso corpóreo), feno e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos ao jejum hídrico de 6 horas e alimentar de 12 horas para realização da tranquilização com cloridrato de xilazina (0,5mg/kg) pela via intravenosa. Também foi realizado anestesia local ao redor do local a ser incisado com cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor, com posterior tricotomia e antissepsia. Após, foram realizadas quatro feridas com 4 cm² na região lombar, duas na face direita e duas na esquerda, uma cranial e outra caudal, distanciadas 10 cm. Ao final, os animais receberam anti-inflamatório pela via intravenosa (fenilbutazona 4,4mg/kg a cada 24 horas durante três dias) para controle da dor e edema. As feridas iniciaram tratamento após 12 horas do procedimento, e eram tratadas com solução fisiológica estéril 0,9% 1 vez ao dia, sendo que as feridas caudais receberam formulação de óleo de copaíba a 10% manipulado, o suficiente para o recobrimento de toda a ferida.

As biopsias foram realizadas aos 21 dias após o procedimento de realização das feridas, observando seu aspecto macroscópico, sendo realizadas na borda da ferida com tecido sadio adjacente com o auxílio de um “punch” de 6mm de diâmetro, e fixadas em formalina e embebidas em parafina para processamento e

armazenadas para posterior uso.

4.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA das amostras FFPE foi utilizado um micrótomo convencional (Leica RM2125) realizando cortes histológicos de espessura de aproximadamente 10µm em cada bloco, trocando a lâmina para não haver contaminação entre as amostras. Foi utilizado solução de *RNaseZap*® em todo os materiais sendo utilizado materiais descartáveis e livre de degradação do RNA por ribonucleases (RNase).

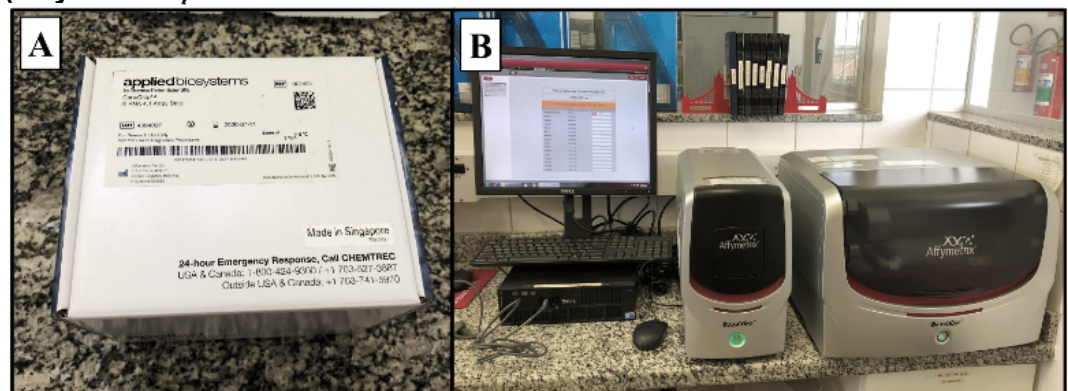
O fragmento de 10µm de cada amostra foi alocado em tubo *Falcon* de 15mL adicionado 5 mL de Xilol, aguardado 10 minutos para retirar o sobrenadante, repetindo o processo. O *pellet* foi transferido para microtubos de poliestireno tipo *Eppendorf* de 2mL (livre de DNAe RNA) adicionado 1,5mL de Etanol a 100% para Biologia Molecular, centrifugado 2 min/14.000 rpm/25°C, retirado o sobrenadante, adicionando novamente 1,5 mL de Etanol a 100%, repetindo o processo. O *pellet* foi secado por 60 minutos, realizando a extração do RNA com o *Kit Qiagen RNeasy FFPE* para extração do RNA total. Após a digestão com proteinase K (para remover as ligações cruzadas do RNA com proteínas), isolamento do RNA, incubação com DNase e purificação do mRNA.

Foi utilizado a espectrofotometria para quantificação de RNA utilizando o *Nanodrop*® para cálculo da concentração de RNA em µg.mL⁻¹: $[RNA] = A_{260} \times Fc \times fd$, onde A_{260} corresponde ao valor de absorbância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; Fc corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; fd corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o resultado é a concentração em ng.µL⁻¹. O kit *RNA 6000 Nano* foi utilizado para mensurar a qualidade do RNA por eletroforese capilar na plataforma *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A métrica DV200 foi usada para calcular a porcentagem dos fragmentos íntegros do RNA com tamanho > 200 nucleotídeos. O *kit* utilizado foi o *Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip*, processado de acordo com as instruções do fabricante.

4.3 Análise do mRNA

Utilizou-se um *kit* de reagente WT PLUS (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) para preparo das amostras de RNA para análise da expressão do transcriptoma no *GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip* (Figura 1 A), (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) obedecendo as instruções do fabricante. Resumidamente, os controles RNA *Poly-A* (*lys*, *phe*, *thr* e *dap*), ausentes nas células eucarióticas foram adicionados às amostras de RNA (controle do ensaio) antes da geração do cDNA. Após o processo de amplificação, o cDNA final foi purificado, quantificado, fragmentado e marcado para hibridação em *strips*. Os *strips* permaneceram durante 20 horas a 48°C num forno de hibridação. Os *strips* foram, então, lavados e corados no sistema robótico *GeneAtlas* (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) (Figura 1 B) usando o *kit GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain* para *WT Array Strips* (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA). Finalmente, os *strips* foram digitalizados usando o sistema de imagens *GeneAtlas* (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA), gerando os arquivos celulares totais. Os valores de intensidade nos arquivos foram corrigidos em segundo plano, transformados em log2 e depois normalizados pelo *software Transcriptome Analysis Console* (TAC) (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), utilizando-se o algoritmo *Robust Multi-array Average* (RMA).

Figura 1 – Imagem fotográfica do GeneChip™ Equine Gene 1.1 ST Array Strip (A) e GeneAtlas (Affymetrix®)



Fonte: LUCAS, F.A., 2020

Foi utilizado o *software Transcriptome Analysis Console* (TAC) (Affymetrix®) para identificação do transcriptoma, empregando-se a análise

estatística ANOVA (*fold change* $\pm 1,5$; FDR corrigido $P < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram identificados oito mRNA diferencialmente expressos quando comparados os grupos tratados e controle das feridas lombares, sendo cinco supra regulados e três infra regulados conforme mostrados na tabela Tabela 1, apresentando a média e desvio-padrão, *fold change* e o valor de P da expressão de mRNA na comparação dos grupos tratamento e controle.

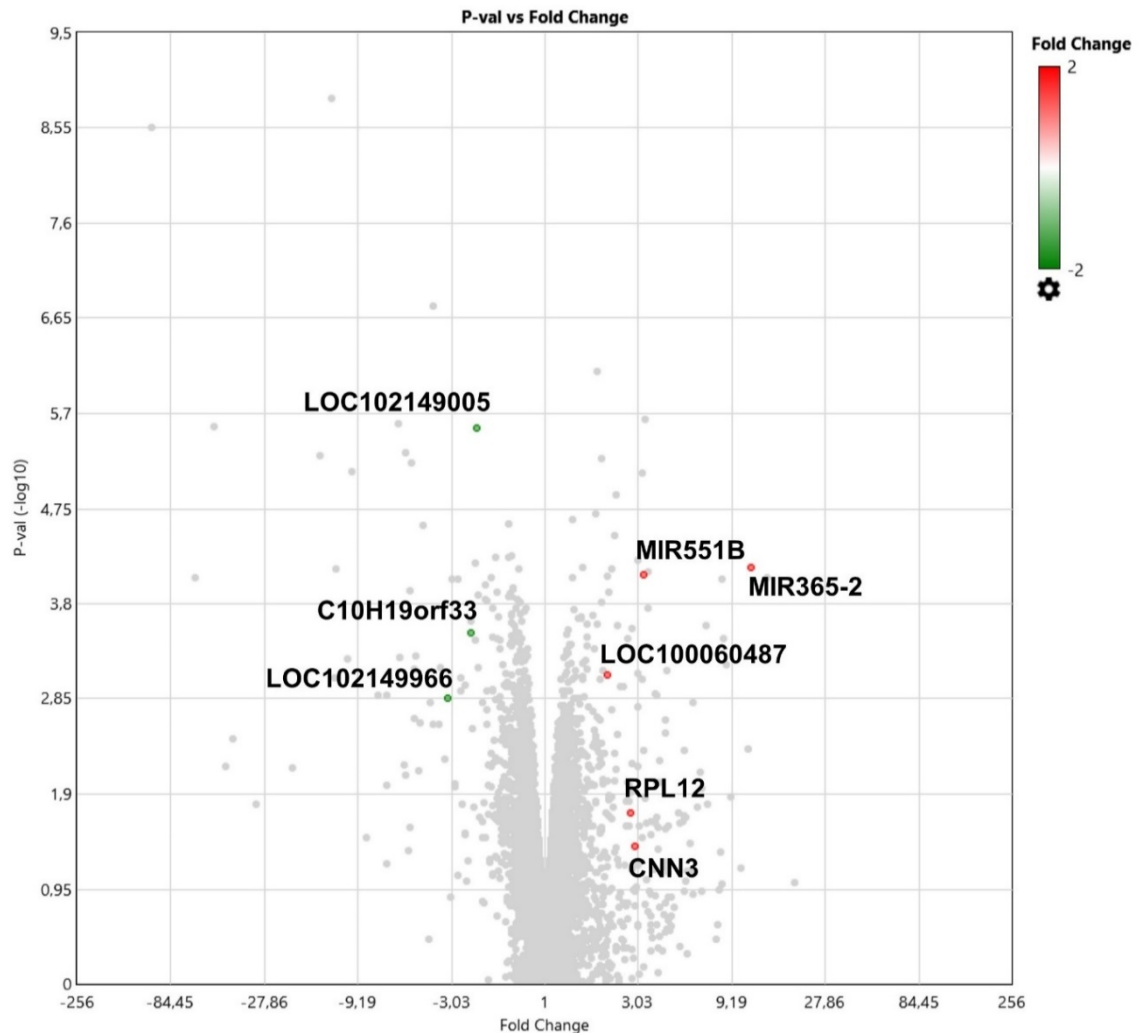
Tabela 1 – Média e desvio-padrão, *fold change* e valor de P dos mRNA diferencialmente expressos, quando comparadas as feridas lombares que receberam o óleo de copaíba a 10% e o grupo controle.

Ferida	GENE	Média e desvio-padrão do grupo (log2)		<i>Fold Chang</i> e	P
		Tratamento	Controle		
Lombar	MIR365-2	4,26 $\pm$ 1,01	0,74 $\pm$ 0,46	11,47	0,00007
	MIR551B	5,11 $\pm$ 0,41	3,42 $\pm$ 0,38	3,23	0,00008
	LOC100060487	3,60 $\pm$ 0,18	2,53 $\pm$ 0,46	2,11	0,00080
	RPL12	1,84 $\pm$ 0,68	0,38 $\pm$ 0,96	2,75	0,01940
	CNN3	2,05 $\pm$ 1,07	0,51 $\pm$ 0,38	2,91	0,04200
	LOC102149005	1,08 $\pm$ 0,16	2,24 $\pm$ 0,22	-2,24	0,00000
	C10H19orf33	1,13 $\pm$ 0,45	2,41 $\pm$ 0,32	-2,42	0,00030
	LOC102149966	2,42 $\pm$ 0,63	4,08 $\pm$ 0,62	-3,18	0,00140

Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 2 mostra, graficamente, e a Figura 3 mostra o mapa de calor, confirmando os mRNA expressos em feridas lombares de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba.

Figura 2 – Volcano plot (Valor de P x Fold change) da expressão dos mRNA quando comparados os grupos tratamento e controle das feridas lombares. Os pontos vermelhos representam graficamente os mRNA supra regulados no grupo tratamento e os pontos verdes representam graficamente os mRNA infra regulados no grupo tratamento, diferencialmente expressos no grupo tratamento.



A partir de análise no *Ensembl Genome Browser 102*, foi possível verificar que dentre os cinco mRNA supra regulados, três estão relacionados a genes (MIR365-2, MIR551B, LOC100060487) que tem como função de RNA não codificante, tendo como produtos os mir-365-2 e mir-551, enquanto o gene RPL12 é relacionado a uma proteína ribossomal e o gene CNN3 codifica a calponina isoforma 3, proteína ligada à actina. Dos três genes infra regulados, o LOC102149005 codifica proteína F6SP29 ainda não caracterizada, relacionada à espécie equina; o gene LOC102149966 que codifica a proteína ligadora de histona H1.10, enquanto o gene C10H19orf33 foi recentemente descrito relacionado com a proteína F6ZWC7.

6 DISCUSSÃO

Foi obtido neste trabalho a análise do transcriptoma de feridas tratadas com ou não com óleo de copaíba a 10% aos 21 dias de cicatrização. A abordagem metodológica abordada permitiu selecionar os RNA mensageiros com transcrição regulada para cima (regulação aumentada) ou para baixo (regulação diminuída) com respectivos genes envolvidos.

Para a extração de RNA à partir de amostras FFPE, a etapa de desparafinização com xilol é sugerida por alguns autores na maioria dos kits específicos para amostras FFEP, pois a retirada incompleta da parafina pode resultar em RNA de qualidade inferior. Na técnica modificada por Belder *et al* (2016), utilizada nesta pesquisa, utilizou-se a mesma quantidade de amostra de tecido FFPE sugerida pelo fabricante do *kit* de extração, porém em um recipiente maior (tubo de 15 mL) e com posterior adição de 5 mL de xilol. Acreditamos que com maior quantidade de xilol em um recipiente maior, a remoção da parafina foi mais efetiva, sendo possível observar valores mais elevados na concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na leitura do Nanodrop®. Visualmente os pellets apresentavam menor quantidade de parafina ao final do processo de desparafinização. Para microarranjos, os kits de extração de mRNA desenvolvidos requerem apenas apenas 300 pares de bases. Dessa maneira, com o mRNA extraído de material parafinado é possível se realizar a maioria das técnicas de biologia molecular, incluindo Northern Blot, PCR, hibridização *in situ* e microarranjos de DNA complementar (BELDER *et al.*, 2016; JOSE *et al.*, 2018; RIBEIRO-SILVA; GARCIA, 2008).

Neste estudo foi possível identificar que o óleo de copaíba a 10% aumentou a regulação de cinco mRNA e diminuiu a regulação de três. Os genes que não codificam proteína que tiveram seu mRNA supra regulados são os MIR365-2, LOC100060487, MIR551B, todos com o biotipo miRNA, sendo os produtos mir-365-2 relacionados aos dois primeiros e mir-551 ao último. Já os genes relacionados aos mRNA infra regulados, o LOC102149005, LOC102149966 e o C10H19orf33, possuem a função de codificar proteína, sendo algumas ainda não descritas.

O gene MIR365-2 já foi descrito associado ao HPV (papiloma vírus humano) de alto risco (ADEBAMOWO *et al.*, 2020), apresentando efeito oncogênico ou supressor em câncer em humanos, atuando na proliferação celular e

tumorigênico, de tal forma que se apresentou supra regulado auxiliando no processo de cicatrização sem a proliferação celular desordenadamente, apresentando melhor organização celular nas feridas tratadas com óleo de copaíba. No câncer de mama em humanos é possível observar um efeito oncogênico, visto que, quando supra regulado é associado ao estágio clínico, de forma que a sua supressão diminui a proliferação e a invasão celular nestes casos (LI *et al.*, 2015). Em contrapartida, sua regulação negativa dependente da p53, desencadeia a proliferação de células gástricas e tumorigênese (GUO *et al.*, 2013), semelhante ao que é observado no carcinoma hepatocelular, cuja baixa regulação de MIR365-2, aumenta a progressão do carcinoma hepatocelular, diminuindo a sobrevivência de pacientes humanos. Já quando elevado inibiu a proliferação e migração celular desta neoplasia (CHEN *et al.*, 2015). Da mesma forma foi observado em células neoplásicas de cólon em modelo de xenoinxerto de rato nude que, quando restaurado injetado no subcutâneo, ocorre inibição da progressão celular e apoptose, diminuindo a tumorigênese (NIE *et al.*, 2012). Com o MIR365-2 supra regulado, podemos sugerir que este fitoterápico acelerou o processo cicatricial promovendo a formação mais precoce do tecido de granulação, sem apresentar descontrole na proliferação celular, fato descrito na pesquisa de Lucas *et al.* (2017).

Os dois principais alvos do MIR365-2 são os marcadores apoptóticos BCL2 e BAX (SINGH; SAINI, 2012; ZHOU *et al.*, 2017), demonstrando participar do processo cicatricial, importante para evitar a presença contínua de fibroblastos ativados prejudicando o processo de contração cicatricial, gerando uma ferida mais plana e com aspecto de tecido mais maduro como foi observado ao utilizar o óleo de copaíba a 10% (LUCAS *et al.*, 2017). A via intrínseca da apoptose é desencadeada, principalmente, por meio das proteínas da família BCL-2 (LEE *et al.*, 2011), apresentando características anti-apoptóticas e pró apoptóticas. A supra regulação do mir-365-2 leva a uma diminuição dos níveis do mRNA BCL2, reduzindo o potencial da membrana mitocondrial ocasionando a liberação de moléculas apoptóticas (SINGH; SAINI, 2012). Em carcinoma cutâneo de células escamosas, a supra regulação do MIR365-2 promove a perda da via BAX, responsável por definir o momento da apoptose, ocasionando a diminuição no potencial apoptótico, contribuindo para o desenvolvimento da neoplasia (ZHOU *et al.*, 2017). Confirmando, dessa forma, a supra regulação deste gene atuando no processo cicatricial envolvendo a apoptose, importante no controle de fibroblastos

no processo cicatricial, provavelmente agindo na proteína BLC2.

O *MIR551B* já foi descrito na literatura participando do processo de apoptose, reforçando o papel do óleo de copaíba no processo de cicatrização atuando no controle da morte celular programada, corroborando com Lucas *et al.*, (2017), que observaram melhor aspecto cicatricial das feridas que receberam o óleo de copaíba a 10% (que foram utilizadas neste estudo). Quando supra regulado, em situações de colangiocarcinoma, é observada diminuição da proliferação celular neoplásica promovendo a apoptose (CAO *et al.*, 2018) semelhante ao que acontece em células neoplásicas gástricas, inibindo a proliferação e invasão celular pela indução da apoptose autofágica das células neoplásicas (WANG *et al.*, 2018).

O *MIR551b-3p* regula positivamente a proteína STAT3 em câncer de ovário, observando que contribui para a resistência à apoptose e aumento da sobrevivência e proliferação de células neoplásicas, possuindo um papel importante na ativação transcricional dessas células ligando-se ao promotor STAT3 (CHALUVALLY-RAGHAVAN *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016). Da mesma forma, já foi observado que nos queloides em humanos ocorre um aumento significativo de STAT3, participando da sua patogênese (LEE *et al.*, 2019). Porém, visto que as feridas tratadas com o fitoterápico apresentaram melhor na organização das células colágenas no processo de cicatrização, este gene não deve ter regulado esta proteína positivamente. É mais provável que tenha sido semelhante ao que foi observado quando o *MIR551B* ligado ao 3'UTR do ZEB1 em câncer de cólon retal, promovendo uma regulação negativa do mRNA do ZEB1 e dos níveis de proteína, reduzindo o tamanho do tumor (KIM *et al.*, 2019). Em um estudo (STONE *et al.*, 2016) sobre o epitélio mesenquimal de transição na reparação tecidual e fibrose em humanos, foi possível observar que a expressão em queratinócitos humanos de HB-EGF, um ligante que ativa o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) durante cicatrização de feridas em humanos, aumentando a ZEB1. Dessa forma é possível inferir que, o *MIR551B* supra regulado no tratamento com óleo de copaíba a 10% em feridas lombares em equinos pode auxiliar no processo de cicatrização diminuindo o ZEB1, semelhante ao que acontece em câncer de cólon retal.

O gene RPL12 tem como produto a proteína ribossomal L12 que possui dois domínios que forma dímeros mediados pelo seu domínio N-terminal (NTD) de forma que cada domínio C-terminal (CTD) é conectado por um segmento ligante

não estruturado formando três domínios globulares fracamente unidos (MULDER *et al.*, 2004). Já foi relacionado com a instabilidade de microssatélites no câncer de cólon colorretal, sendo indicador de prognóstico (YU *et al.*, 2019). As proteínas ribossomais (RPs) compreendem parte estrutural do ribossomo, possuindo funções extras incluindo a ativação de vias dependentes ou independentes p53 em resposta ao estresse ocasionando em parada do ciclo celular e apoptose (KANG *et al.*, 2021), ainda não descrita em feridas, sendo necessário mais pesquisas para entender sua função no processo de cicatrização quando supra regulado.

A família das proteínas calponinas ligadas à actina possui três isoformas derivadas de três diferentes genes: CNN1 (h1 - calponina básica), CNN2 (h2 - caponina neutral) e CNN3 (h3 – calponina ácida) (LIU; JIN, 2016). O gene CNN3 tem como produto uma proteína de ligação à actina expressa em células musculares lisos ou não, importante na reestruturação do citoesqueleto da actina e cicatrização de feridas (NAIR *et al.*, 2019), apresentando supra regulada em feridas tratadas com o óleo de copaíba a 10%, permitindo um melhor aspecto macroscópico. Por meio da ativação da quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK)1/2, induz a migração de fibroblastos, de forma que sua diminuição provoca o bloqueio da atividade ERK1/2 e da fosforilação não muscular de seu substrato caldesmon, uma proteína de ligação à actina que regula suas interações com a actinmiosina, confirmando que a CNN3 controla a migração dos fibroblastos pela regulação da fosforilação do L-caldesmon mediada pelo ERK1/2, resultando em aumento da atividade de cicatrização de feridas (APPEL *et al.*, 2010). Tais informações corroboram com o fato do gene desta proteína estar supra regulado em feridas tratadas com óleo de copaíba 10%, melhorando as características macroscópicas das mesmas.

O CNN3 é controlado principalmente pelas modificações pós-transcricionais, sendo que, quando diminuído em fibroblastos primários, há um prejuízo na formação nas fibras de tensão, participando, portanto, da remodelação da tensão das fibras de actina, necessárias para a motilidade celular e contração dos fibroblastos dérmicos no processo de cicatrização de feridas (DAIMON; SHIBUKAWA; WADA, 2013), sendo de grande importância a sua supra regulação no processo cicatricial que, apesar de não ser observado diferença estatística na contração da ferida lombar ao comparar os grupos tratado e controle (LUCAS *et al.*, 2017), foi possível observar maior deposição de matriz colagenosa organizada,

associada à redução do processo inflamatório e da neovascularização (dados não publicados). Em tecido de granulação há expressão de CNN3 por fibroblastos, co-localizado nas fibras de tensão actina formadas nas células, sendo que na fase inicial deste tecido, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos expressando a α -actina de músculo liso (α -SMA) para formar fibras de tensão, participando da contractilidade da ferida (DAIMON; SHIBUKAWA; WADA, 2013; HINZ *et al.*, 2001). Essas fibras de tensão são importantes estruturas contráteis em muitas células, e, esses feixes de actomiosina estão em grande quantidade em fibroblastos, musculatura lisa, endotélio e em algumas linhas de células neoplásicas (TOJKANDER; GATEVA; LAPPALAINEN, 2012). As forças contráteis por contatos de adesão focal exercida pelos miofibroblastos, ligam o citoesqueleto intracelular à MEC, sendo observado que as feridas lombares apresentaram taxa de contração mais elevadas que feridas na região do metacarpo (LUCAS *et al.*, 2017), conforme o esperado, visto que na região lombar há uma contração centrípeta, tecido de granulação mais fino, maior formação de crostas, também sendo favorecido pela pele solta e móvel da região do tronco do animal (JACOBS; TOWNSEND, 1984; LUCAS *et al.*, 2017; RAMSEY *et al.*, 1995).

O gene LOC102149005, infra regulado nas feridas tratadas neste estudo, codifica proteína F6SP29, relacionada à espécie equina, que ainda não foi caracterizada, possuindo similaridade de 90% com a acil-coA desidrogenase de cadeia curta e ramificada (ACADSB), semelhante à proteína mitocondrial, sendo necessários mais estudos para relacionar esta proteína em menor quantidade durante o processo de cicatrização adequada. Até o momento, na literatura consultada, sabe-se que o ACADSB é um regulador chave do metabolismo lipídico em células do epitélio mamário bovina (JIANG *et al.*, 2021), de forma que os lipídios não servem apenas como um componente indispensável para a pele, mas também participam do desenvolvimento e progressão dos queloides em humanos ativando a resposta inflamatória crônica (HUANG; OGAWA, 2013). Dessa forma, se a proteína F6SP29, cuja semelhança de 90% com a ACADSB, possuir os mesmos efeitos no processo de cicatrização de feridas, é essencial que permaneça infra regulado a fim de manter o processo cicatricial adequada conforme observado nas feridas tratadas com o fitoterápico.

O gene C10H19orf33 foi recentemente descrito relacionado com a proteína F6ZWC7, apresentando poucas informações sobre sua função, não

apresentando dados na literatura. Demonstrou similaridade de 50% com diversas proteínas, entre elas a IMUP-HUMAN (gene IMUP C19orf33), que possui potencial oncogênico no câncer de tireoide envolvendo a apoptose, relacionada à sua malignidade e menos sobrevida (LIN *et al.*, 2020). Apesar da similaridade, são importantes novas pesquisas a fim de definir o papel da proteína F6ZWC7 no processo de cicatrização quando seu gene se apresenta infra regulado.

O gene LOC102149966 codifica a proteína ligadora de histona H1.10. As proteínas ligadoras de histonas H1 são fundamentais para a compactação de cromatina, regulação da transcrição e espaçamento de nucleossomos e cromossomos, não sendo componentes do núcleo dos nucleossomos e sim ligando-se ao DNA do ligante local de entrada e saída desses nucleossomos, apresentando uma multifuncionalidade por meio de interações com proteínas, recrutando-as para a cromatina (KALASHNIKOVA; ROGGE; HANSEN, 2016). A H1.10 é uma histoma independente de replicação, expressa em células somáticas, localizado na periferia nuclear formando uma estrutura semelhante a um anel e, juntamente com outros tipos de H1, se perdem temporariamente na cromatina durante a reprogramação epigenética, sendo o H1.10 o último a se dissociar (IZZO *et al.*, 2017).

Apesar de ambas as feridas, controle e tratadas, não apresentarem distúrbios no processo proliferativo nem inflamatório, foi notável pela avaliação clínica, um aspecto cicatricial superior nas feridas tratadas (LUCAS *et al.*, 2017), sendo proposto que há relação com a provável inibição da proteína ligadora de histona H1.10, ao apresentar seu gene infra regulado. Os fatores epigenéticos são definidos como alterações do DNA sem o envolvimento da sequência dos pares de bases, regulando funções celulares, contribuindo para muitas patologias, inclusive no desenvolvimento de queloides em humanos relacionando as modificações de histonas (STEVENSON *et al.*, 2021), sendo que a inibição de histona desacetilase 2 (HDAC2) diminui a fibrose em pele (FITZGERALD O'CONNOR *et al.*, 2012) de forma que está envolvida na inibição da inflamação, sendo que o seu nível de expressão foi associado ao grau de proliferação tecidual em traqueia humana (HUANG *et al.*, 2021). Tem aumentado o número de estudos relacionado à modificação de histonas e o queloide humano, sendo que a inibição de histona desacetilases resulta em inibição da proliferação, migração e invasão celular, bloqueando a progressão do ciclo celular e a expressão gênica de de vias

relacionadas à fibrose (STEVENSON *et al.*, 2021), justificando a infra regulação de seu mRNA no processo de cicatrização em ambos os grupos, controle e tratado, com diminuição gradativa de polimorfonucleares e aumento de células mononucleares sem produção de tecido de granulação exuberante, porém com melhor aspecto cicatricial macroscópico nas feridas tratadas com o óleo de copaíba 10% (LUCAS *et al.*, 2017)

Este é o primeiro estudo relacionado ao transcriptoma de mRNA de feridas lombares em equinos tratados com óleo de copaíba 10%.

7 CONCLUSÃO

Com a metodologia empregada neste estudo, as feridas tratadas com óleo de copaíba a 10% apresentaram mRNA de cinco genes supra regulados MIR365-2, MIR551B, LOC100060487, RPL12 e CNN3, já descritos como relacionados ao controle de crescimento do tecido de granulação, apoptose, migração fibroblástica e a qualidade e organização do processo de cicatrização; e mRNA de três genes infra regulados LOC102149005, LOC102149966 e C10H19orf33, envolvendo a proteína ligadora de histona, com relatos de seu papel na inibição da fibrose na pele de humanos

Tais dados permitirão analisá-los, individualmente, a fim de se identificar de pontos-chave para novas condutas terapêuticas frente aos avanços promissores no campo da terapia gênica de feridas em equinos, principalmente àquelas em membros em que a formação de TGE é um problema comum.

REFERÊNCIAS

- ABDUEVA, D.; WING, M.; SCHAUB, B. *et al.* Quantitative expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples by affymetrix microarrays. **J Mol Diagn**, v. 12, n. 4, p. 409-417, Jul 2010.
- ADEBAMOWO, S. N.; ADEYEMO, A. A.; ROTIMI, C. N. *et al.* Genome-wide association study of prevalent and persistent cervical high-risk human papillomavirus (HPV) infection. **BMC Med Genet**, v. 21, n. 1, p. 231, Nov 23 2020.
- APPEL, S.; ALLEN, P. G.; VETTERKIND, S. *et al.* h3/Acidic calponin: an actin-binding protein that controls extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity in nonmuscle cells. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 8, p. 1409-1422, Apr 15 2010.
- BEHZADI, P.; RANJBAR, R. DNA microarray technology and bioinformatic web services. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 66, n. 1, p. 19-30, Mar 1 2019.
- BELDER, N.; COSKUN, O.; ERDOGAN, B. D. *et al.* Optimization of gene expression microarray protocol for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Genom Data**, v. 7, p. 303-306, Mar 2016.
- BOOS, G. S.; NOBACH, D.; FAILING, K. *et al.* Optimization of RNA extraction protocol for long-term archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues of horses. **Exp Mol Pathol**, v. 110, p. 104289, Oct 2019.
- CAO, J.; SUN, L.; LI, J. *et al.* A novel threemiRNA signature predicts survival in cholangiocarcinoma based on RNASeq data. **Oncol Rep**, v. 40, n. 3, p. 1422-1434, Sep 2018.
- CASTON, S. S. Wound care in horses. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 28, n. 1, p. 83-100, Apr 2012.
- CHALUVALLY-RAGHAVAN, P.; JEONG, K. J.; PRADEEP, S. *et al.* Direct Upregulation of STAT3 by MicroRNA-551b-3p Deregulates Growth and Metastasis of Ovarian Cancer. **Cell Rep**, v. 15, n. 7, p. 1493-1504, May 17 2016.
- CHEN, Z.; HUANG, Z.; YE, Q. *et al.* Prognostic significance and anti-proliferation effect of microRNA-365 in hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 2, p. 1705-1711, 2015.
- CHRISTIE, J. D. Microarrays. **Crit Care Med**, v. 33, n. 12 Suppl, p. S449-452, Dec 2005.

DA TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. Copaifera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, May 18 2018.

DAHLGREN, L. A. Regenerative Medicine Therapies for Equine Wound Management. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 34, n. 3, p. 605-620, Dec 2018.

DAIMON, E.; SHIBUKAWA, Y.; WADA, Y. Calponin 3 regulates stress fiber formation in dermal fibroblasts during wound healing. **Arch Dermatol Res**, v. 305, n. 7, p. 571-584, Sep 2013.

DE ALBUQUERQUE, K. C.; DA VEIGA, A. D.; SILVA, J. V. *et al.* Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with Copaifera. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 8350320, 2017.

DOUGHERTY, E. R. Small sample issues for microarray-based classification. **Comp Funct Genomics**, v. 2, n. 1, p. 28-34, 2001.

EGAWA, G.; KABASHIMA, K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 11, p. 2178-2185, Nov 2011.

FARIA, N. D. A. A. **Aspectos morfométricos e histológicos do tegumento de equinos das raças Árabe e Quarto de Milha**. 2009. 52 f. Dissertação de mestrado - , Universidade Estadual Paulista (Unesp), Aleph. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/95946>.

FEITOSA, D. J. S. J.; DE CARVALHO, L. T. F.; ROCHA, I. R. O. *et al.* Effects of Copaiba oil in the healing process of urinary bladder in rats. **Int Braz J Urol**, v. 44, n. 2, p. 384-389, Mar-Apr 2018.

FITZGERALD O'CONNOR, E. J.; BADSHAH, II; ADDAE, L. Y. *et al.* Histone deacetylase 2 is upregulated in normal and keloid scars. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 4, p. 1293-1296, Apr 2012.

G., L. V. M. L. P. B. F. S. A. M. E. S. S. A. V. M. N. S. A. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **NATUREZA ONLINE**, 2, v. 7, p. 61-67, 2009.

GARRIDO, N.; GARCIA-HERRERO, S.; MESEGUER, M. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 1008-1022, Mar 15 2013.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S. *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, Jul 1 2008.

GUO, S. L.; YE, H.; TENG, Y. *et al.* Akt-p53-miR-365-cyclin D1/cdc25A axis contributes to gastric tumorigenesis induced by PTEN deficiency. **Nat Commun**, v. 4, p. 2544, 2013.

HAERTEL, E.; WERNER, S.; SCHAFER, M. Transcriptional regulation of wound inflammation. **Semin Immunol**, v. 26, n. 4, p. 321-328, Aug 2014.

HARMAN, R. M.; THEORET, C. L.; VAN DE WALLE, G. R. The Horse as a Model for the Study of Cutaneous Wound Healing. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 10, n. 7, p. 381-399, Jul 2021.

HENDRIX, S. M.; BAXTER, G. M. Management of complicated wounds. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 21, n. 1, p. 217-230, Apr 2005.

HINZ, B.; CELETTA, G.; TOMASEK, J. J. *et al.* Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 9, p. 2730-2741, Sep 2001.

HUANG, C.; OGAWA, R. Roles of lipid metabolism in keloid development. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 60, May 1 2013.

HUANG, Z.; WEI, P.; GAN, L. *et al.* Expression of histone deacetylase 2 in tracheal stenosis models and its relationship with tracheal granulation tissue proliferation. **Exp Ther Med**, v. 21, n. 5, p. 444, May 2021.

IZZO, A.; ZIEGLER-BIRLING, C.; HILL, P. W. S. *et al.* Dynamic changes in H1 subtype composition during epigenetic reprogramming. **J Cell Biol**, v. 216, n. 10, p. 3017-3028, Oct 2 2017.

JACOBS, K. A. L. D. H. F. P. B.; TOWNSEND, H. G. G. Comparative Aspects of the Healing of Excisional Wounds on the Leg and Body of Horses. *Veterinary Surgery*, 13(2), 83-90 | 10.1111/j.1532-950X.1984.tb00765.x. **Veterinary Surgery**, 2, v. 12, p. 83-90, 1984.

JIANG, P.; IQBAL, A.; WANG, M. *et al.* Transcriptomic Analysis of Short/Branched-Chain Acyl-Coenzyme a Dehydrogenase Knocked Out bMECs Revealed Its Regulatory Effect on Lipid Metabolism. **Front Vet Sci**, v. 8, p. 744287, 2021.

JOSE, V.; FUMAGALLI, D.; ROTHE, F. *et al.* Feasibility of developing reliable gene expression modules from FFPE derived RNA profiled on Affymetrix arrays. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0203346, 2018.

KALASHNIKOVA, A. A.; ROGGE, R. A.; HANSEN, J. C. Linker histone H1 and protein-protein interactions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1859, n. 3, p. 455-461, Mar 2016.

KANG, J.; BRAJANOVSKI, N.; CHAN, K. T. *et al.* Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. **Signal Transduct Target Ther**, v. 6, n. 1, p. 323, Aug 30 2021.

KIM, K. S.; JEONG, D.; SARI, I. N. *et al.* miR551b Regulates Colorectal Cancer Progression by Targeting the ZEB1 Signaling Axis. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 5, May 27 2019.

KRIZKOVA, S.; KEPINSKA, M.; EMRI, G. *et al.* Microarray analysis of metallothioneins in human diseases--A review. **J Pharm Biomed Anal**, v. 117, p. 464-473, Jan 5 2016.

LEE, S. P.; PARK, S.; PARK, J. *et al.* Clinicopathologic characteristics of CD99-positive diffuse large B-cell lymphoma. **Acta Haematol**, v. 125, n. 3, p. 167-174, 2011.

LEE, Y. S.; LIANG, Y. C.; WU, P. *et al.* STAT3 signalling pathway is implicated in keloid pathogenesis by preliminary transcriptome and open chromatin analyses. **Exp Dermatol**, v. 28, n. 4, p. 480-484, Apr 2019.

LEPAULT, E.; CELESTE, C.; DORE, M. *et al.* Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. **Wound Repair Regen**, v. 13, n. 5, p. 520-529, Sep-Oct 2005.

LI, M.; LIU, L.; ZANG, W. *et al.* miR365 overexpression promotes cell proliferation and invasion by targeting ADAMTS-1 in breast cancer. **Int J Oncol**, v. 47, n. 1, p. 296-302, Jul 2015.

LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. **J Bioinform Comput Biol**, v. 10, n. 6, p. 1231003, Dec 2012.

LIN, L.; WEN, J.; LIN, B. *et al.* Immortalization up-regulated protein promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of papillary thyroid cancer. **J Cell Mol Med**, v. 24, n. 23, p. 14059-14072, Dec 2020.

LINDGREN, G.; NABOULSI, R.; FREY, R. *et al.* Genetics of Skin Disease in Horses. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 36, n. 2, p. 323-339, Aug 2020.

LIU, R.; JIN, J. P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. **Gene**, v. 585, n. 1, p. 143-153, Jul 1 2016.

LUCAS, F. D. A.; KANDROTAS, A. L.; NARDIN, E. *et al.* Copaiba oil in experimental wound healing in horses. **Ciência Rural**, v. 47, 2017.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biol**, v. 9, p. 34, May 31 2011.

MARZANCOLA, M. G.; SEDIGHI, A.; LI, P. C. DNA Microarray-Based Diagnostics. **Methods Mol Biol**, v. 1368, p. 161-178, 2016.

MASSON, D. S.; SALVADOR, S. L.; POLIZELLO, A. C. M. *et al.* Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, p. 664-669, 2013.

MATEJUK, A. Skin Immunity. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 66, n. 1, p. 45-54, Feb 2018.

MIRAGLIOTTA, V.; LEFEBVRE-LAVOIE, J.; LUSSIER, J. G. *et al.* OB-cadherin cloning and expression in a model of wound repair in horses. **Equine Vet J**, v. 40, n. 7, p. 643-648, Nov 2008.

MULDER, F. A.; BOUAKAZ, L.; LUNDELL, A. *et al.* Conformation and dynamics of ribosomal stalk protein L12 in solution and on the ribosome. **Biochemistry**, v. 43, n. 20, p. 5930-5936, May 25 2004.

MUSELLA, V.; CALLARI, M.; DI BUDUO, E. *et al.* Use of formalin-fixed paraffin-embedded samples for gene expression studies in breast cancer patients. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123194, 2015.

NAIR, V. A.; AL-KHAYYAL, N. A.; SIVAPERUMAL, S. *et al.* Calponin 3 promotes invasion and drug resistance of colon cancer cells. **World J Gastrointest Oncol**, v. 11, n. 11, p. 971-982, Nov 15 2019.

NIE, J.; LIU, L.; ZHENG, W. *et al.* microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 220-225, Jan 2012.

OLIVEIRA, D. F. F.; NASCIMENTO, T. P.; RODRIGUES, C. H. *et al.* Antimicrobial potential of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae) against bubaline

mastitis multiresistant isolates. **An Acad Bras Cienc**, v. 92, n. 4, p. e20200521, 2020.

PLOMIN, R.; SCHALKWYK, L. C. Microarrays. **Dev Sci**, v. 10, n. 1, p. 19-23, Jan 2007.

RAMSEY, D. T.; POPE, E. R.; WAGNER-MANN, C. *et al.* Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **Am J Vet Res**, v. 56, n. 7, p. 941-949, Jul 1995.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RIBEIRO-SILVA, A.; GARCIA, S. B. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 123-130, 2008.

SCHAFER, M.; WERNER, S. Transcriptional control of wound repair. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 69-92, 2007.

SCOTT, D. W. Large animal dermatology. 1988 1988.

SEGUNDO-VAL, I. S.; SANZ-LOZANO, C. S. Introduction to the Gene Expression Analysis. **Methods Mol Biol**, v. 1434, p. 29-43, 2016.

SHARMA, H. Y.; MANDY, A.; SANDEEP. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. 2021/11/19 2021. Text.

SILVA, M. A. D.; PEREIRA, A. C.; MARIN, M. C. *et al.* The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. **J Clin Exp Dent**, v. 5, n. 4, p. e169-173, Oct 1 2013.

SILVA, P. F.; BRITO, M. V.; PONTES, F. S. *et al.* Copaiba oil effect on experimental jaw defect in Wistar rats. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 2, p. 120-126, Feb 2015.

SINGH, R.; SAINI, N. Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis--a combined computational and experimental approach. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 6, p. 1568-1578, Mar 15 2012.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017.

STEVENSON, A. W.; DENG, Z.; ALLAHHAM, A. *et al.* The epigenetics of keloids. **Exp Dermatol**, v. 30, n. 8, p. 1099-1114, Aug 2021.

STONE, R. C.; PASTAR, I.; OJEH, N. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. **Cell Tissue Res**, v. 365, n. 3, p. 495-506, Sep 2016.

TALUKDAR, A. H.; CALHOUN, M. L.; STINSON, A. W. Microscopic anatomy of the skin of the horse. **Am J Vet Res**, v. 33, n. 12, p. 2365-2390, Dec 1972.

TAO, Z.; SHI, A.; LI, R. *et al.* Microarray bioinformatics in cancer- a review. **J BUON**, v. 22, n. 4, p. 838-843, Jul-Aug 2017.

TEIXEIRA, F. B.; DE BRITO SILVA, R.; LAMEIRA, O. A. *et al.* Copaiba oil-resin (Copaifera reticulata Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 313, Jun 14 2017.

THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 21, n. 1, p. 1-13, Apr 2005.

THEORET, C. L.; OLUTOYE, O. O.; PARNELL, L. K. *et al.* Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study. **Vet Surg**, v. 42, n. 7, p. 783-789, Oct 2013.

THEORET, C. L.; WILMINK, J. M. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 3, p. 365-371, May-Jun 2013.

TOJKANDER, S.; GATEVA, G.; LAPPALAINEN, P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 8, p. 1855-1864, Apr 15 2012.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. New insights on keloids, hypertrophic scars, and striae. **Dermatol Clin**, v. 32, n. 2, p. 193-209, Apr 2014.

URASAKI, Y.; BEAUMONT, C.; TALBOT, J. N. *et al.* Akt3 Regulates the Tissue-Specific Response to Copaiba Essential Oil. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 8, Apr 19 2020.

URASAKI, Y.; BEAUMONT, C.; WORKMAN, M. *et al.* Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 7, Mar 25 2020.

WAIBEL, J.; PATEL, H.; CULL, E. *et al.* Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study on Efficacy of Copaiba Oil in Silicone-Based Gel to Reduce Scar Formation. **Dermatol Ther (Heidelb)**, v. 11, n. 6, p. 2195-2205, Dec 2021.

WANG, Y.; FAN, X.; XU, F. *et al.* Expression of miR-551b and its effect on apoptosis in human gastric carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 11, n. 5, p. 2912-2919, 2018.

WEAVER, D.; GOPALAKRISHNAN, K.; JOE, B. Large-Scale Transcriptome Analysis. **Methods Mol Biol**, v. 1527, p. 1-26, 2017.

WEI, Z.; LIU, Y.; WANG, Y. *et al.* Downregulation of Foxo3 and TRIM31 by miR-551b in side population promotes cell proliferation, invasion, and drug resistance of ovarian cancer. **Med Oncol**, v. 33, n. 11, p. 126, Nov 2016.

WHITFIELD, M. L.; GEORGE, L. K.; GRANT, G. D. *et al.* Common markers of proliferation. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 2, p. 99-106, Feb 2006.

YASOJIMA, E. Y.; TEIXEIRA, R. K.; HOUAT ADE, P. *et al.* Effect of copaiba oil on correction of abdominal wall defect treated with the use of polypropylene/polyglecaprone mesh. **Acta Cir Bras**, v. 28, n. 2, p. 131-135, Feb 2013.

YU, C.; HONG, H.; ZHANG, S. *et al.* Identification of key genes and pathways involved in microsatellite instability in colorectal cancer. **Mol Med Rep**, v. 19, n. 3, p. 2065-2076, Mar 2019.

ZHOU, L.; GAO, R.; WANG, Y. *et al.* Loss of BAX by miR-365 Promotes Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Progression by Suppressing Apoptosis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, May 30 2017.

ANEXO – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação da expressão recíproca miRNA-mRNA de feridas experimentais de equinos tratadas ou não com óleo de copaiba"**, Processo FOA nº 00301-2018, sob responsabilidade de Flavia de Almeida Lucas apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Maio de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Analysis of reciprocal miRNA-mRNA expression. Of experimental wounds of horses treated or not copaiba oil"**, Protocol FOA nº 00301-2018, under the supervision of Flavia de Almeida Lucas presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: Dezembro 01, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3638-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br