

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

RAFAELA SPERANZA BAPTISTA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS
TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

ARAÇATUBA

2021

RAFAELA SPERANZA BAPTISTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS
TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA**

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

Orientador: Prof. Adjunto Luiz Claudio Nogueira Mendes

Co-orientadores: Profa. Dra. Fernanda Bovino; Prof. Dr. Marcio Carvalho da Costa

ARAÇATUBA

2021

B222a Baptista, Rafaela Speranza
Análise da expressão de miRNA em feridas tratadas com óleo de
copaíba / Rafaela Speranza Baptista. -- Araçatuba, 2021
59 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Luiz Claudio Nogueira Mendes
Coorientador: Profa. Dra. Fernanda Bovino; Prof. Dr. Marcio
Carvalho da Costa

1. Cavalos. 2. Cicatrização. 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).

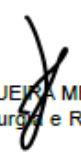
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
COORIENTADORA: FERNANDA BOVINO
COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

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


Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

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

Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Dra. ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIAÇÃO (Participação Virtual)
Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 04 de outubro de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
COORDINADORA: FERNANDA BOVINO
COORDINADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

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

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. 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

Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Dra. ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIACÃO (Participação Virtual)
Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 04 de outubro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

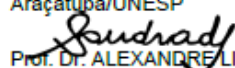
Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
COORIENTADORA: FERNANDA BOVINO
COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

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

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

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

Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Dra. ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIAÇÃO (Participação Virtual)
Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 04 de outubro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
COORDINADORA: FERNANDA BOVINO
COORDINADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

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

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

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

Prof. Dr. PAULO ALBUCCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Dra. ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIAÇÃO (Participação Virtual)
Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 04 de outubro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNA EM FERIDAS TRATADAS COM ÓLEO DE COPAÍBA

AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES
COORIENTADORA: FERNANDA BOVINO
COORIENTADOR: MARCIO CARVALHO DA COSTA

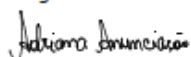
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

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

Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP


Dra. ADRIANA RAQUEL DE ALMEIDA DA ANUNCIAÇÃO (Participação Virtual)
Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 04 de outubro de 2021.

**À minha família que mesmo estando longe,
sempre esteve por perto!**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, minha base! Sem eles nada seria possível na minha vida, obrigada por toda a força que recebo desde criança e que jamais largaram minha mão. Amo vocês!

À toda a minha família, em especial ao Vô Nim, Vó Jura, que vibram com todas as minhas conquistas e que me colocam diariamente nas suas orações.

Ao meu orientador Luiz Claudio. Muito obrigada por ter confiado em mim quando nem eu mesma confiava! Aprendi muito nessa caminhada ao seu lado e sei que sempre estará ao meu lado quando eu precisar! Valeu toda paciência, estresse, puxões de orelha e gargalhadas. Você foi essencial por isso aqui!

À Professora Flavia Lucas, não tenho nem palavras para agradecer o que fez por mim nessa reta final do meu doutorado! Sem você nada disso seria possível. Minha eterna gratidão e admiração pela pessoa e profissional que é.

À minha coorientadora Professora Fernanda, que sempre esteve ao meu lado e juntamente com o Professor Leydson e não mediram esforços para me ver bem! Muito obrigada pela companhia de sempre, vocês sempre serão meu ponto de apoio aqui em Araçatuba!

Ao empurrão especial que a Professora Juliana Peiró me deu, me fazendo criar coragem e passar seis meses fora de casa! Todo meu carinho por você só aumenta em cada conselho!

Ao meu coorientador Professor Marcio, obrigada por me aceitar no seu mundo, do outro lado do mapa, e me deixar acompanhar de perto sua rotina e ensinamentos.

Dani e Carol, minhas amigas e companheiras de pós graduação, estivemos juntas nessa caminhada! Naty, que foi morar longe, mas esteve sempre perto quando precisei! Gabi, a qual o exército uniu e Araçatuba reuniu! Tenho que agradecer todo socorro e desabafo de sempre. Vocês têm um lugarzinho especial no meu coração!

Ao Almir por toda a companhia nessa caminhada árdua!

Aos amigos que fiz nas universidades por onde passei, seja nos meus dias frios lá em Saint-Hyacinthe ou nos meus dias quentes aqui em Araçatuba, que cada um, com seu jeito único, tornou minha caminhada mais agradável.

A todos de que alguma forma que conquistaram um lugar especial em minha vida no “AraçaTexas”. Vocês estiveram presentes nas minhas batalhas de dias quentes e estarão eternamente nas minhas lembranças!

Aos amigos sempre que ao longo da vida entenderam todas as minhas recusas e ausências, desde os convites de aniversários até aquelas reuniões sem motivo algum, em decorrência da distância.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante a realização do meu doutorado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do apoio financeiro ao projeto de pesquisa (2018/05131-0).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária, campus de Araçatuba. Cheguei aqui em 2013 e por ser tão bem recebida e o tanto que me fez crescer tanto pessoal como profissionalmente, vai ser difícil largar!

À Deus, por me permitir olhar para trás e ver que a nunca fui desamparada. Nas horas mais complicadas, junto à Nossa Senhora Aparecida sempre recorro e tenho consolo. Ilumine sempre minha caminhada e me dê aquela “forcinha” que recorro na proteção e cuidado aos animais, com o auxílio do São Francisco de Assis, a quem também escuta bastante minhas suplicas.

E não menos importante, meu eterno agradecimento a todos os animais que um dia tive o prazer de encontrar e cuidar. Hoje me sinto completa com a minha profissão e sem eles, nada seria possível. Prometo continuar lutando por cada vida como se fosse única, amenizando as dores e defendendo o que faço por todo o mundo!

Enfim, meu muito obrigada!

“Quero sempre poder ter um sorriso estampado em meu rosto, mesmo quando a situação não for muito alegre... E que esse meu sorriso consiga transmitir paz para os que estiverem ao meu redor.”

Mario Quintana

BAPTISTA, R.S. **Análise da expressão de miRNA em feridas tratadas com óleo de copaíba**. 2021. 59 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

Objetivou-se analisar o transcriptoma de miRNA de feridas cutâneas experimentais de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba a partir de amostras anteriormente biopsiadas, fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). A cicatrização de feridas é um processo biológico que restaura a integridade física da pele. Biópsias obtidas e armazenadas há sete anos pelo método FFPE de feridas experimentais em região metacárpica de quatro animais foram utilizadas, sendo provenientes da borda da ferida e do tecido sadio subjacente equinos do grupo controle e do tratamento, que receberam óleo de copaíba a 10% topicamente. A extração de RNA, devidamente quantificado e qualificado foi realizada para processamento de miRNA. As amostras escaneadas pelo *GeneAtlas* (*Affymetrix*®) e genes identificados com auxílio do software *Transcriptome Analysis Console* (*Affymetrix*®), empregando-se a análise estatística ANOVA (*fold change* $\pm 1,5$; FDR corrigido $P < 0,05$). Comparando-se os grupos tratamento e controle, três miRNAs equinos diferencialmente expressos foram identificados: *eca-miR-450c*, *eca-miR-98* e *eca-miR-487b*, todos supra regulados no grupo tratamento.

Palavras-chave: Cavalos. Cicatrização. Transcriptoma.

BAPTISTA, R.S. **Analysis in miRNA expression in wounds treated with copaíba oil.** 2021. 59 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The aim was analyze the miRNA transcriptome of skin wound in horses treated or not with copaíba oil from fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE) samples previously biopsied. Wound healing is a biological process that restores skin physical integrity. Biopsies obtained and stored seven years ago by FFPE method of experimental wounds in the metacarpal region of four animals were used, coming from the wound margins and the underlying healthy tissue of the control and treatment group horses, which received 10% copaíba oil topically. The properly quantified and qualified RNA extraction was performed for miRNA processing. The samples scanted by GeneAtlas (Affymetrix®) and genes identified with the aid of the Transcriptome Analysis Console (Affymetrix® software), using the statistical analysis ANOVA (fold change ± 1.5 ; FDR corrected $p < 0.05$). Comparing the treatment and control groups, three differentially expressed equine miRNAs were identified: eca-miR-450c, eca-miR-98 and eca-miR-487b, all superregulated in the treatment group.

Keywords: Horses. Healing. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem fotográfica dos tubos *Falcon* contendo amostras parafinadas diluídas em Xileno – Lucas, F.A., 2020. 31
- Figura 2 - Imagem representativa do *GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix®)* utilizado para análise global de miRNA (A) e *GeneAtlas (Affymetrix®)* (B) – Lucas, F.A., 2020. 32
- Figura 3 - *Volcano plot* (Valor de P x *Fold change*) da expressão dos miRNAs quando comparados os grupos tratamento e controle das feridas metacárpicas. Os pontos vermelhos representam graficamente os miRNAs *eca-miR-450c* (seta azul), *eca-miR-98* (seta verde) e *eca-miR-487b* (seta vermelha), diferencialmente expressos no grupo tratamento. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio-padrão, *fold change* e valor de P dos miRNA diferencialmente expressos, quando comparadas as feridas metacárpicas que receberam o óleo de copaíba a 10% e o grupo controle. 34

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
FFPE	Fixadas em formalina embebida em parafina
miRNA	MicroRNA
UTR	Região Não Traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
mm	Milímetro
RNase	Ribonuclease
µm	Micrômetro
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
DNase	Desoxirribonuclease
nm	Nanômetro
Fc	Fator de conversão
fd	Fator de diluição
ng	Nanograma
µL	Microlitro
TAC	Transcriptome Analysis Console
ANOVA	Análise de variância
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
CDKN1A	Inibidor da quinase dependente de ciclina 1
p21	Proteína p21

qPCR	PCR quantitativo em tempo real
HIF1 α	Proteína do fator induzível por hipóxia 1 α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	Via de sinalização do tipo Wntless
TGF- α	Fator de crescimento transformador- α
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ECM	Matriz extra celular
TGE	Tecido de granulação exuberante
IL-9	Interleucina-9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Revisão Bibliográfica	17
1.2	Objetivo	29
1.3	Hipóteses	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	Animais	30
2.2	Extração de RNA	31
2.3	Análise do miRNA	33
3	RESULTADOS	33
4	DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO – Comitê de Ética	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão bibliográfica

A pele tem como função servir de barreira protetora contra o meio externo, tanto contra patógenos, luz ultravioleta, produtos químicos e lesões mecânicas, além de atuar na termorregulação corpórea. Composta basicamente por duas camadas, epiderme e derme. Abaixo encontra-se uma camada de tecidos adiposos e conjuntivos, além de vasos sanguíneos, chamada de hipoderme ou tecido celular subcutâneo, servindo como camada isolante e auxiliando a fixar a pele às estruturas subjacentes. Cada estrutura tem sua própria anatomia e função específica. Há variação em quantidade e qualidade entre as diferentes raças e os próprios indivíduos por conta da área, idade e até mesmo sexo (HARMAN; THEORET; WALLE, 2021; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SCOTT; MILLER, 2011; SINGER; SAXBY; FRENCH, 2003; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2018).

A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, derivado do ectoderma embrionário. É a camada externa da pele constituída por várias camadas de queratinócitos, em sua maioria, em estados diversos de diferenciação, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SCOTT; MILLER, 2011). No equino, conta com cinco a sete camadas de espessura variando de 30 a 100 milímetros (média de 53mm), também chamados de estratos, denominadas da mais interna para a mais externa (SCOTT; MILLER, 2011):

- Basal: composto por uma única fileira de células colunares ou cuboides, ligeiramente basófilas. Também chamada de germinativa, por sua atividade mitótica através das células troncos, queratinócitos basais, responsáveis, junto com o estrato espinhoso, pela renovação da epiderme. Tem como função também a produção da membrana basal, que fixa a epiderme à derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; WAKURI et al., 1995). Os hemidesmosmosos são junções intercelulares, distribuídos ao longo da face interna dos queratinócitos basais, responsáveis pela adesão dermoepidérmica. A ligação dos filamentos intermediários de queratina aos hemidesmosmosos nos queratinócitos da membrana basal envolve vários componentes, incluindo

as integrinas (família de receptores adesivos da superfície celular), que além de muitas funções mediam a adesão dos colágenos tipo I e IV às células (SCOTT; MILLER, 2011).

- Espinhosa: formada por camadas de células cuboides ou ligeiramente achatadas (cerca de três a cinco de espessura), de volume maior que os da camada basal, levemente basofílicas a eosinofílicas, nucleadas e citoplasma com feixes filamentosos de queratina. Nesse estrato os queratinócitos são unidos por junções do tipo desmossomo, que com os filamentos de queratina mantem a coesão das células epidermais e a tornam resistentes ao atrito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KAMEL et al., 2013).

- Granulosa: possuem de uma a duas células em espessura achatadas e basofílicas, possui os grânulos de querato-hialina e lamelares que são responsáveis pela formação de filamentos das estruturas acima e barreira contra a penetração de substâncias (SOTIROPOULOU; BLANPAIN, 2012).

- Lúcida: também chamada de conjuntiva, constituída de células mortas, anucleadas, com o citoplasma repleto de filamentos de queratina e alguns desmossomos entre as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A derme é um tecido conjuntivo de espessura variável, de origem mesodérmica, composta por duas regiões. Área de onde se originam os folículos pilares. Há vascularização, responsável por nutrição e termorregulação, além de vasos linfáticos glândulas sudoríparas e sebáceas (NASALAPURE et al., 2017). Sua camada papilar é fina e constituída por um tecido conjuntivo frouxo com a formação das papilas dérmicas responsáveis pela nutrição da epiderme que não é vascularizada. A camada reticular é mais espessa, composta pelo tecido conjuntivo denso que tem como função principal a elasticidade cutânea (FARIA, 2009; HARMAN; THEORET; WALLE, 2021; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). É um sistema relativamente composto de fibras insolúveis que resistem à tração, e polímeros solúveis que resistem ou dissipam as forças compressivas. As fibras são colágenas e elastina e as macromoléculas solúveis, proteoglicanos e hialuronos. Fibras de colágeno espessas e densamente dispostas paralelas à superfície da pele e fibras de elastina mais espessas e em menor quantidade estão dispostas na derme profunda. Na superficial, as fibras de elastina são mais delgadas e elásticas (SCOTT; MILLER, 2011).

As fibras dérmicas são formadas por fibroblastos, são colágenas, reticulares e elásticas. O colágeno é uma fibra da família das moléculas relacionadas a diversas funções biológicas, tais como morfogênese, reparo tecidual, adesão e migração celular, quimiotaxia e agregação plaquetária. Sua biossíntese é um complexo processo de transposição e tradução de genes, modificações intracelulares e extracelulares, além de montagem e reticulação de fibrilas (SCOTT; MILLER, 2011; TODHUNTER et al., 1994).

Existem diversos tipos de moléculas de colágeno que tem genética e estruturas próprias. Três deles são fibrilares, tipo I, III e V. O tipo IV está presente nas microfibrilas, com funções estruturais. Todos esses estão bem distribuídos por toda a derme. O colágeno tipo IV também é encontrado na membrana basal (SHAH; PIERCE; SILVER, 2017). As collagenases são essenciais na remodelação fisiológica ou patológica do colágeno, vários tipos celulares contribuem para a destruição do tecido conjuntivo por sua capacidade de sintetizar e liberá-la. Os fibroblastos são sua principal fonte dérmica, mas queratinócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos podem liberar algumas enzimas proteolíticas, incluindo a collagenase (NASALAPURE et al., 2017; SCOTT; MILLER, 2011).

A perda da integridade causada por lesões mecânicas de origens química, traumática ou cirúrgica, é denominada ferida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SINGER; CLARK, 1999; SINGER; SAXBY; FRENCH, 2003). Isso pode variar de uma simples ruptura na integridade epitelial da pele ou pode ser mais profundo, estendendo-se para o tecido subcutâneo com danos a outras estruturas, como tendões, músculos, vasos, nervos, órgãos parenquimatosos e até mesmo ossos (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

O custo econômico gerado por feridas em equinos não está bem documentado, mas elas seguem entre as principais ocorrências tratadas mundialmente e de grande preocupação com o bem-estar animal (HARMAN; THEORET; WALLE, 2021; SELLS et al., 2010; THEORET; BOLWELL; RILEY, 2015). Na literatura há pouca informação sobre ocorrências, diferentes tratamentos e seus resultados efetivos ou fatores de risco associados a problemas cicatriciais (ALLEN et al., 2020).

A cicatrização de feridas é um processo biológico que restaura a integridade física da pele (MCHEIK et al., 2014; WU et al., 2015). Envolve uma complexa, dinâmica e bem orquestrada série de eventos: os tecidos conjuntivos

devem ser reparados e a ferida completamente reepitelizada através de regeneração, retornou à estrutura e função anatômica normal, sem necessidade de cuidados terapêuticos. Algumas feridas não cicatrizam de maneira ordenada e oportuna, o que gera cronicidade e o processo de cicatrização fica desordenado podendo gerar um tecido de granulação ou cicatrizes hipertróficas (ENOCH; LEAPER, 2008; JACOBS et al., 1984).

A cascata desse reparo é regulada por peptídeos de fatores de crescimento, as citocinas. Quando há lesão, a produção e secreção de fatores de crescimento, principalmente por plaquetas e macrófagos localizados na borda da ferida, são iniciadas e o processo inflamatório e cicatricial é iniciado (SINGER; CLARK, 1999; THEORET et al., 2001). A remodelação de uma ferida aguda é rigidamente controlada por mecanismos reguladores com o objetivo de manter um delicado equilíbrio entre degradação e síntese, levando à cura normal (BAUM; ARPEY, 2005).

Como o equino é uma presa na natureza, geralmente apresenta respostas rápidas ao perigo e alguns ferimentos são comuns de ocorrer durante essa fuga, principalmente na parte distal dos membros (WILMINK et al., 1999). Esses ferimentos, os mais comuns na espécie, geram perda de tecidos moles, o que gera atraso na epitelização bem como a propensão a desenvolver tecido de granulação exuberante (THEORET et al., 2001). Outros problemas comuns nessas áreas são o suprimento sanguíneo insuficiente, tensão de pele e estruturas adjacentes por conta da articulação, ausência de musculatura subjacente, muitas proeminências ósseas, além da própria movimentação excessiva (ALFORD; CALDWELL; HANSON, 2012; BOOTH; KNOTTENBELT, 1999; COCHRANE; PAIN; KNOTTENBELT, 2003).

Um estudo demonstrou que fibroblastos isolados dos membros em equinos, cresciam relativamente mais lentos se comparados aos do tronco (WILMINK et al., 1999). Há um perfil de citocinas enviesado em favor de mediadores do fibrinogênio (SCHWARTZ et al., 2005). A contração deficiente pode ser devido a um arranjo dos miofibroblastos inadequado e o perfil das citocinas, que impedem uma atividade contrátil adequada (WILMINK et al., 2002). Feridas em áreas de movimentos excessivos, como por exemplo sobre articulações, ou orientadas perpendicularmente às linhas tensionais cutâneas, costumam formar quantidade desproporcional de tecido cicatricial e até mesmo por conta da movimentação, as bordas da ferida se abrem ao sustentar o peso ou flexão do membro durante a passada (KNOTTENBELT, 1997).

O processo cicatricial em equinos difere em indivíduos adultos e fetos. Nos animais adultos está fortemente relacionado à inflamação que desencadeia um processo cicatricial bem desenvolvido (CHOI et al., 1996). Nos fetos, há pouca inflamação resultando num final sem cicatrizes, além dos baixos níveis de fatores de crescimento no local da ferida. Esse fator é importante pela regeneração tecidual e não por cicatrizes (ADZICK; LORENZ, 1994).

A intensidade da cicatrização cutânea é diferente nas regiões corpóreas do equino. Na parte inferior do pescoço e do tronco, é intensificada pela contração de uma fina camada de musculo estriado localizado abaixo da fáscia superficial. Já em feridas na parte superior do pescoço, face e membros, que cicatrizam por epitelização, há migração de queratinócitos sobre o tecido de granulação (HARMAN; THEORET; WALLE, 2021). Feridas nas partes distais são descritas na literatura com cicatrização mais lenta pois precisam de uma fase de preparação mais longa por conta da maior retração, sendo essa muito superior se comparado a outras partes do corpo, taxas mais lentas e término mais precoce da contração, além da fase de epitelização devagar (JACOBS et al., 1984; THEORET et al., 2001; WILMINK et al., 1999).

Os membros dos equinos têm grande capacidade de produzir tecido de granulação, muitas vezes tem sua função inibida por um longo período por conta desse processo cicatricial. Feridas em superfície flexora do membro são preocupantes, pois o tecido cicatricial e as aderências fibrosas podem atrapalhar ou até mesmo interromper a função mecânica normal dos tendões flexores e outras estruturas ligamentares. Como a estrutura normal é necessária para a movimentação fisiológica, o tratamento das feridas é sempre uma corrida contra o relógio na tentativa de preservar a função motora (GAUGHAN, 2018).

As feridas das porções distais de membros geralmente cicatrizam por segunda intenção, requerendo cuidados intensivos e prolongados, necessitando de meses de cuidados em muitos casos, para então obter um resultado desejável, sendo fonte de pesquisa constante em técnicas e produtos que auxiliem no processo (ALFORD; CALDWELL; HANSON, 2012). As áreas mais comuns de lesões em equinos envolvem as regiões do metacarpo, metatarso, boleto (articulação metacarpofalângica) e coroa do casco (BOOTH; KNOTTENBELT, 1999).

Segundo pesquisa comparando a cicatrização de membro distal e outros pontos (tórax, ombro e flanco), as feridas distais mostraram-se mais granuladas e com mais demora no processo quando comparado às outras. A conclusão foi de que a fase

cicatricial foi maior, provavelmente devido a maior retração das bordas, infiltração tardia de miofibroblastos nas feridas da parte distal do membro e no corpo a musculatura subjacente tenha contribuído para a redução precoce no tamanho da ferida (JACOBS et al., 1984).

As feridas crônicas em equinos possuem fisiopatologia semelhante à feridas crônicas de humanos (COCHRANE; PAIN; KNOTTENBELT, 2003; JØRGENSEN et al., 2017), como por exemplo úlceras, feridas de pressão (MUSTOE; O'SHAUGHNESSY; KLOETERS, 2006). Há uma vertente de estudos sobre os mecanismos de cicatrização de feridas nessas espécies por décadas. Pela variação da cicatrização em diferentes partes do corpo, em especial aos membros distais que são por epitelização semelhante ao humanos, os equinos proporcionam pesquisas de múltiplas feridas para diferentes tratamentos e partes corpóreas em um mesmo animal, gerando a coleta de diversas amostras para posterior análise (HARMAN; THEORET; WALLE, 2021).

Os seres humanos tem a pele fortemente aderida ao tecido conjuntivo, dependendo de epitelização para a cicatrização primária, seguida pela granulação estromal, migração e contração de miofibroblastos, similar a cicatrização da pele da porção distal dos membros dos cavalos (THEORET et al., 2013). A semelhança é associada à hipóxia, devido a um baixo grau de inflamação crônica (SØRENSEN et al., 2014). Uma diferença sutil entre essas espécies é a alta concentração de plaquetas sanguíneas que os humanos tem se comparado aos cavalos, o que pode afetar a taxa de coagulação e então alterar a resposta inflamatória inicial. Não há evidencias comprovadas que isso possa diferenciar a cicatrização nas espécies citadas, mas o conhecimento sobre elas pode auxiliar nas pesquisas para determinar quais condições da pele humana precisam ser atentadas ao buscar as respostas mais assertivas no modelo experimental equino (BOUDREAUX; EBBE, 1998; HARMAN; THEORET; WALLE, 2021).

Toda lesão tecidual, gera uma lesão vascular com extravasamento de sangue, iniciando as respostas celulares e moleculares para a hemostasia e até que não seja realizada, não há início da cicatrização. Os processos para que isso ocorra são vasoconstrição, agregação plaquetária, deposição de fibrina, com o resultado sendo a formação do coágulo, impedindo a perda de fluidos e eletrólitos no local da ferida, limitando a contaminação externa (LAWRENCE, 1998).

A vasoconstrição é iniciada por aminas vasoativas, quando a derme é lesionada. A adrenalina é liberada para a circulação periférica e o sistema nervoso simpático é estimulado para a liberação da noradrenalina. As células que foram lesionadas secretam prostaglandinas, como o tromboxano, que também agem nesse processo (MONACO; LAWRENCE, 2003). A agregação plaquetária é estimulada pela exposição aos fatores teciduais liberados pelas células lesionadas. As plaquetas aderem ao endotélio vascular, unindo-se umas às outras em um processo que envolve fibrinogênio e outros fatores de coagulação (CINES et al., 1998). As cascatas de coagulação são compostas por componentes intrínsecos e extrínsecos, acionados individualmente. A via intrínseca não é necessária para a coagulação normal e ocorre quando o sangue é exposto à superfícies estranhas. Já a via extrínseca é essencial para o processo e é ativada por um fator tecidual que é encontrado nas superfícies extravasculares, principalmente nos fibroblastos (STIERNBERG et al., 2018).

A inflamação tem seus sinais característicos, dor, rubor, edema e calor após a vasodilatação, onde há aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos para o espaço extravascular (LAWRENCE, 1998). Tem como função trazer células inflamatórias para a área, que serão responsáveis pelo controle de bactérias, eliminação dos detritos das células mortas e da matriz danificada para dar procedimento ao processo cicatricial (MAJNO; SHEA; LEVENTHAL, 1969). Inicialmente começa a ativação das vias clássica e alternativa do complemento, levando à infiltração de granulócitos. Durante a fase inflamatória tardia, as fibras de colágeno ficam evidentes nas margens da ferida, há proliferação de células epiteliais que continuam a produzir a cobertura da camada epidérmica espessada (ENOCH; LEAPER, 2008).

O processo cicatricial é regulado pelas citocinas que controlam a ativação dos genes responsáveis pela migração e proliferação celular. Proveniente de plaquetas e macrófagos, o controle da liberação das citocinas é regulado por outras citocinas e pelo próprio tecido lesionado (MONACO; LAWRENCE, 2003).

A fase proliferativa é caracterizada pela migração dos fibroblastos, deposição da matriz extracelular e formação de tecido de granulação. Com a progressão desta fase, a matriz proliferativa é substituída por um tecido de granulação recém formado. A epitelização da ferida representa o final da fase proliferativa (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993).

Os fibroblastos proliferam profusamente e produzem as proteínas da matriz hialurônica, fibronectina, proteoglicanos e pro colágeno tipo 1 e tipo 3. Após um tempo, alteram seu fenótipo para miofibroblasto. Nesse estágio, eles contêm feixes de actina abaixo da membrana plasmática e estendem ativamente, aderindo à fibronectina e ao colágeno na matriz extracelular (RAMASASTRY, 2005). A contração da ferida, evento importante no processo reparativo que ajuda a aproximar as bordas da ferida, ocorre à medida que essas extensões de células se retraem. Tendo realizado esta tarefa, os fibroblastos são eliminados por apoptose (GREENHALGH, 1998).

O processo de angiogênese é ativado por diversos fatores, em particular pela diminuição da tensão do oxigênio, uma vez que um severo grau de hipoxia no tecido resulta tanto na ruptura dos vasos presente quanto no aumento do consumo de oxigênio pelas células da ferida (WITTE; BARBUL, 1997). Essa neovascularização é regulada por uma variedade de citocinas, e as concentrações diminuem à medida que a área lesionada torna-se revascularizada (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Para a epitelização, a migração das células epiteliais começa nas bordas da ferida algumas horas após o ferimento. Uma única camada de células se forma inicialmente sobre a lesão, acompanhada pelo aumento acentuado na atividade mitótica das células epiteliais ao redor das bordas da ferida. As células que migram através, se ligam à matriz provisória. Quando as células epiteliais em avanço se encontram, a migração para e a membrana basal começa a se formar (BAUM; ARPEY, 2005; DIEGELMANN; EVANS, 2004).

A fase final da cicatrização da ferida é a remodelação, onde há o desenvolvimento do novo epitélio e o tecido cicatricial final (ENOCH; LEAPER, 2008). A síntese da matriz extracelular nas fases proliferativa e de remodelação é iniciada simultaneamente com o desenvolvimento do tecido de granulação (HESS, 2000). Com a maturação da matriz intracelular, os feixes de colágeno aumentam o diâmetro, e há degradação do ácido hialurônico e da fibronectina (BAUM; ARPEY, 2005).

As fibras de colágeno podem recuperar grande parte da resistência original em comparação a um tecido sem lesão. A força final dessas fibras depende da localização da ferida e duração do processo, mas a força original do tecido não poderá ser recuperada na sua totalidade (CLARK, 1993; ROBSON; STEED; FRANZ, 2001). A síntese e a degradação do colágeno, além da remodelação da matriz extracelular ocorrem continuamente e tendem a se estacionar algumas semanas após a lesão (CLARK, 1993; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

A deposição inicial de feixes de colágeno é desorganizada, ao longo do tempo torna-se mais orientada e reticulada, isso ocorre nas fases finais da remodelação, após o início da contração da ferida. O tecido conjuntivo subjacente diminui de tamanho e aproxima as margens da ferida, devido às interações dos fibroblastos com a matriz extracelular (CLARK, 1993; MONACO; LAWRENCE, 2003; SINGER; CLARK, 1999).

À medida que a ferida cicatriza, a densidade de fibroblastos e macrófagos é reduzida pela apoptose. O crescimento de capilares cessa, com diminuição do fluxo sanguíneo e da atividade metabólica no local da ferida (BAUM; ARPEY, 2005). Como resultado final observa-se uma cicatriz totalmente amadurecida com um número reduzido de células e vasos sanguíneos e uma alta resistência à tração (O'KANE, 2002; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

A avaliação precisa da ferida é essencial para alcançar um resultado satisfatório tanto para o equino, quanto para o proprietário. A localização, magnitude, provável comprometimento de tecidos mais profundos ou subjacentes, bem como o tecido perdido na lesão são pontos importantes a serem observados. Considerar as complicações auxiliará no direcionamento do tratamento, maximizando o potencial cicatricial, diminuindo o tempo de afastamento do animal das suas atividades, alcançando o resultado da maneira mais satisfatória possível (EGGLESTON, 2018; GAUGHAN, 2018)

Uma grande variedade de curativos usados para o processo de cicatrização está disponível comercialmente. Para selecionar o curativo a ser utilizado, é preciso entender os estágios de cicatrização da ferida, bem como a condição, localização, tipo e sua profundidade e comprometimento de estruturas abaixo da pele (KAMUS; THEORET, 2018). O tipo mais comumente utilizado é o tópico, tendo como objetivo remover os debris celulares, reduzir a contaminação, interferindo minimamente nas atividades fisiológicas necessárias para a reparação tecidual. Há uma infinidade de produtos para o tratamento das feridas. Cabe ao profissional avaliar o que melhor se adequa à situação (STASHAK; THEORET, 2009). A decisão de fechar ou não a ferida com uma bandagem é outro ponto que deve ser avaliado em cada circunstância (WILMINK et al., 1999). A combinação de terapias é um fator a ser considerado para auxiliar o processo da cicatrização (LEISE, 2018).

A limpeza pode ser realizada de forma mecânica, esfregando com gaze ou escova, ou química, através de agentes antissépticos, e sempre envolverá

desbridamento e diminuição da contaminação do tecido desvitalizado. A forma e a força que essa higienização deve ser feita tem que ter uma linha sutil de equilíbrio, para que o potencial dano ao tecido não supere o efeito desejado (FREES, 2018).

Antimicrobianos tópicos podem ser usadas no tratamento de lesões contaminadas agudas e no de feridas com granulação crônica. O uso sistêmico tem sido utilizado de forma criteriosa, visto que a resistência antimicrobiana é crescente. Feridas crônicas desenvolvem biofilme superficial que atrasa a cicatrização, e este impede que os antimicrobianos sistêmicos cheguem na ferida, apenas os tópicos. Embora a literatura relate que algumas pomadas podem afetar a microcirculação e a perfusão local, seus benefícios superam os efeitos deletérios e realmente auxiliam o processo cicatricial (LEISE, 2018; PETER et al., 2002).

A fitoterapia é uma arte milenar e tem sido utilizada frequentemente na forma de obter benefícios durante a cicatrização de feridas em humanos e animais (PIRIZ et al., 2014). Relatos experimentais no tratamento de feridas em membros distais de equinos relatam uso de princípios como: barbatimão (MARTINS et al., 2003), óleo de fígado do bacalhau com mel (MAHMOUD ALI; RADAD, 2011), extrato de calêndula (BOSCARATO et al., 2020), óleo de girassol puro e ozonizado (FILIPPO et al., 2020), óleo de andiroba puro e ozonizado (ARAUJO et al., 2017) e óleo de copaíba (LUCAS et al., 2017).

O óleo de copaíba tem sido constantemente estudado por suas propriedades na atividade microbiana, apesar das diferentes espécies da árvore encontradas e utilizadas nos estudos (SANTOS et al., 2008; TOBOUTI et al., 2017). Efeitos terapêuticos são relatados na eficácia em inflamações, tumores, como diurético, antisséptico do sistema urinário, na indústria cosmética (MONTES et al., 2009; PAIVA et al., 2002). Na cicatrização, alguns estudos comprovam efeitos benéficos nas fases cicatriciais, na contração da ferida, processo regenerativo e com isso redução no tempo total de cicatrização (AMORIM et al., 2017; LUCAS et al., 2017; PAIVA et al., 2002).

Por meio da análise cromatográfica do óleo de copaíba foi verificado que a fração volátil é composta por sesquiterpenos, que solubiliza uma fração resinosa, composta por diterpenos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). A região sesquiterpênica é composta predominantemente por β -cariofileno, seguida de α -humuleno, mas também possui componentes importantes como o α -bisaboleno. Já a região diterpênica é composta por ácido copálico, ácido agalático, ácido 11-

hidroxicopálico, 11-acetoxi-copálico, ácido hardwickiico e o ácido carenóico, entre outros (PAIVA, 2004). A oleorresina extraída pode variar em relação à concentração e natureza dos diprtenos e sesquiterpenos presentes, de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos ou fatores abióticos. Porém apenas essas classes podem estar presentes na composição da oleorresina pura (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O óleo de copaíba na concentração de 10% tem obtido resultados excelentes no processo cicatricial. Em modelo experimental de úlcera cutânea na orelha de coelhos, promoveu estímulo da fibroplasia, reepitelização e remodelamento cutâneo (MASSON et al., 2013). Em feridas na região metatársica de equinos promoveu maior taxa de contração nos animais tratados em comparação ao grupo controle (LUCAS et al., 2017).

A tecnologia do *microarray* é uma ferramenta poderosa de alto rendimento capaz de monitorar a expressão de milhares de pequenos ácidos ribonucleicos (RNA) não codificantes de em uma única análise e de várias amostras (LIU et al., 2008). Os resultados obtidos de expressão gênica produziram informações de extrema importância sobre como o transcriptoma é implantado em diferentes células e tecidos, como há alteração na expressão gênica ao longo do desenvolvimento, fenótipos de doença e variação entre as espécies e indivíduos (MALONE; OLIVER, 2011).

Outra vantagem que esta tecnologia oferece é a possibilidade de obter milhares de conjuntos de genes a partir de uma pequena amostra, com estimativa de erro dos dados zero (DOUGHERTY, 2001), muitas vezes sendo o número de amostras entre dois e cinco (DAS et al., 2013; GIT et al., 2010; HEIDARI et al., 2016). A robustez da técnica permite, inclusive, avaliar a expressão gênica em uma única célula (SCHULTZE; BEYER, 2016). O fato dos genes avaliados no microarranjo serem previamente anotados pode também reduzir o tempo despendido na análise bioinformática (DAS et al., 2013). A compreensão da regulamentação da rede transcricional que controla a reepitelização pode descobrir novos alvos terapêuticos que possam promover reepitelização e cicatrização adequada de feridas (BOUDRA; RAMSEY, 2020).

Para estudos em biologia molecular, o congelamento do tecido fresco é o método mais recomendado para a preservação do RNA, mas usualmente amostras obtidas de fragmentos obtidos após procedimentos cirúrgicos são fixadas em formalina e embebidas em parafina para posterior análises (RIBEIRO-SILVA;

GARCIA, 2008). Pesquisas satisfatórias tem sido realizadas validando técnicas para extração do RNA a partir de amostras fixadas desta forma, possibilitando que esses blocos parafinizados inicialmente para uma análise histopatológica, possam ser utilizados nos estudos moleculares (ABDUEVA et al., 2010; MUSELLA et al., 2015; RIBEIRO-SILVA; GARCIA, 2008).

Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE) são importantes fontes de amostras para estudos retrospectivos. Estudos de expressão gênica de células malignas e microambiente tumoral têm contribuído para o entendimento da patogênese e do prognóstico das doenças, assim como para aperfeiçoar a classificação das mesmas. A fixação em formalina é o método mais utilizado na preservação de tecidos para estudos de anatomia patológica. É custo-efetiva, de fácil manuseio, além de preservar as características morfológicas celulares adequadamente (GOUVEIA et al., 2011). O tecido FFPE é uma amostra clínica amplamente disponível para estudos retrospectivos. A possibilidade de acompanhamento clínico a longo prazo de amostras de FFPE os torna uma fonte valiosa para avaliar as ligações entre informação molecular e clínica. Em diversas instituições de ensino e pesquisa existem bancos de amostras extremamente valiosos (BELDER et al., 2016). Algumas pesquisas tem sido feitas validando técnicas e kits para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) para que este banco de dados em blocos parafinizados possam ser disponibilizados para estudos de biologia molecular (ABDUEVA et al., 2010; MUSELLA et al., 2015; RIBEIRO-SILVA; GARCIA, 2008).

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de moléculas de RNA não codificantes que possuem cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, capazes de se ligar diretamente à região 3'-não traduzida (UTR) de seu RNA mensageiro, resultando na degradação do mesmo ou inibição da proteína tradutora. Participam da regulação de vários processos biológicos por meio da inibição da expressão de sua proteína alvo (AMBROS, 2004; STASZEL et al., 2011).

Quando há níveis alterados de miRNAs, relacionam-se a várias doenças as quais são responsáveis em modular diversas vias celulares fisiológicas e patológicas (HÉBERT; DE STROOPER, 2009; SZABO; BALA, 2013). Alguns miRNAs alterados são liberados na circulação, onde são mais estáveis e possuem meia-vida mais longa em comparação com outros nucleotídeos circulatórios (JOGLEKAR et al., 2016).

Inicialmente descritos na circulação, especificamente, nas plaquetas, eritrócitos e células sanguíneas nucleadas (CARELLA et al., 2017), são notavelmente estáveis sob diversas condições e alguns estudos sugeriram que esses miRNAs circulatórios endógenos são protegidos de uma forma que a degradação circulatória não os afeta, são presumivelmente envolvidos em micropartículas como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, ou associados a proteínas de ligação a RNA ou complexos de lipoproteína e isso ajuda para evitar a degradação (ARROYO et al., 2011; CREEMERS; TIJSEN; PINTO, 2012; VALADI et al., 2007).

1.2 Objetivo

Objetivou-se analisar o transcriptoma de miRNAs de feridas cutâneas experimentais de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba a partir de amostras anteriormente biopsiadas, fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE).

1.3 Hipóteses

Possibilidade de extração de RNAs a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina para realização de microtranscriptoma

O óleo de copaíba a 10% traz benefícios à cicatrização, e há indícios que haja ativação de vias metabólicas do processo de cicatrização em equinos.

Baseando-se na literatura existente, assimilar os miRNAs supra regulados no grupo tratado com óleo de copaíba a 10% para encaminhar futuras pesquisas quanto a vias metabólicas envolvidas na cicatrização de equinos.

2 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 Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade

de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

2.1 Animais

Foram utilizadas biopsias obtidas de pesquisa anterior, que foram coletadas, fixadas em formalina, embebidas em parafina e encontravam-se armazenadas há sete anos em blocos parafinados.

Na pesquisa anterior, quatro cavalos, sem raça definida, ambos sexos, saudáveis foram mantidos durante todo o período experimental em baia com cama de maravalha, alimentados com ração comercial (1.5% do peso corpóreo), feno e água *ad libitum*.

Após jejum hídrico e alimentar, de seis e 12 horas respectivamente, os animais foram tranquilizados com cloridrato de xilazina (0.5mg/kg) pela via intravenosa e anestesia local com cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor ao redor do local a ser incisado. Foi realizada tricotomia seguida de antissepsia.

Duas feridas foram realizadas na região dorsolateral do osso metacarpo, uma proximal e uma distal, distanciadas oito centímetros, com auxílio de molde 2x2cm, sendo em dois animais no membro direito e nos outros dois, no membro esquerdo.

Após o processo cirúrgico, os animais receberam pela via intravenosa fenilbutazona (4.4mg/kg), a cada 24 horas durante três dias para controle da dor e edema. Uma vez ao dia, todas as feridas eram tratadas com solução salina estéril 0.9%, as distais recebiam formulação de óleo essencial de copaíba a 10% (manipulado em farmácia de manipulação comercial de confiança) em quantidade para cobrir todo o leito excisado. Então eram cobertas com ataduras de crepe sobre gaze estéril até completa cicatrização.

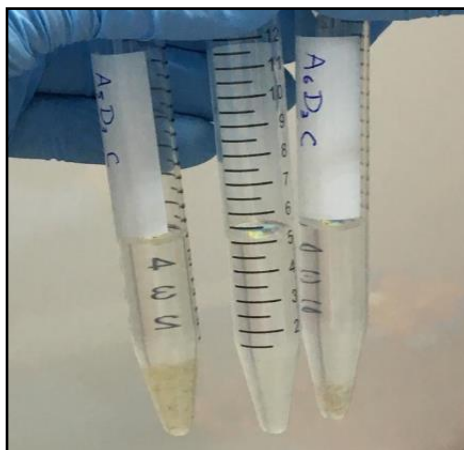
As biopsias foram realizadas aos 21 dias após o procedimento cirúrgico, com o auxílio de um “punch” de 6mm de diâmetro, na borda da ferida e do tecido sadio adjacente. As amostras foram fixadas em formalina e embebidas em parafina durante seu processamento e armazenadas para posterior uso.

2.2 Extração de RNA

A extração do RNA das amostras FFPE ocorreu conforme método descrito na literatura (BELDER et al., 2016). Utilizando-se um micrótomo convencional (Leica RM2125), a partir de cada bloco foram obtidos cortes histológicos de espessura de aproximadamente 10 μ m, sendo que para cada bloco, uma nova navalha foi utilizada, para não haver contaminação entre as amostras. Antes de cada reação, as bancadas e os instrumentos foram borrifados com a solução *RNaseZap*®. Todos os procedimentos foram feitos com luvas descartáveis e todas as ponteiros e microtubos eram livres de degradação do RNA por ribonucleases (RNase).

Foram obtidos, em média, cinco fragmentos de 10 μ m de cada amostra, utilizando-se micrótomo histológico, totalizando oito amostras, sendo quatro amostras do grupo controle e quatro amostras do grupo tratamento. Cada amostra seccionada foi adicionada a um tubo *Falcon* de 15mL (Figura 1). Ao tubo foram adicionados 5 mL de Xilol, aguardado 10 minutos e retirado o sobrenadante, repetindo o processo mais duas vezes.

Figura 1: Imagem fotográfica dos tubos Falcon contendo amostras parafinadas diluídas em Xilol



Fonte: LUCAS F.A., 2020

Os *pellests* foram transferidos para tubos *Eppendorf* de 2mL (livre de DNA e RNA) e a cada um deles adicionados 1,5 mL de Etanol a 100% para Biologia Molecular. Após 5 minutos, os tubos de *Eppendorf* foram centrifugados por 2 min/14.000 rpm/25°C e retirado o sobrenadante para descarte e adicionado novamente mais 1,5 mL de Etanol a 100%, centrifugado e retirado o sobrenadante.

Os tubos de *Eppendorf* foram deixados abertos para secagem dos pellets, em média de 60 minutos.

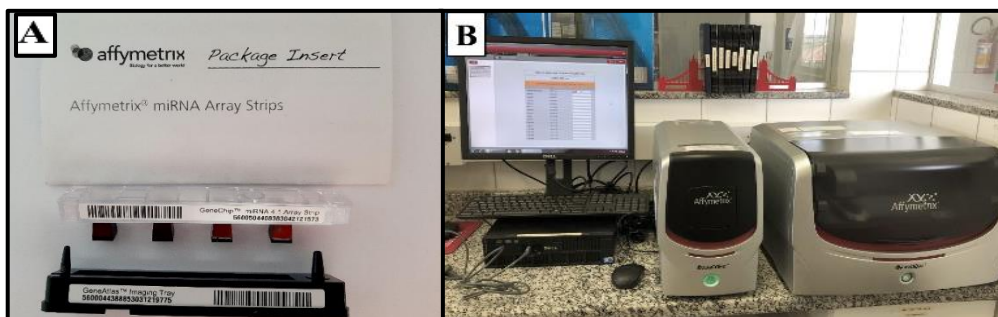
Na sequência, foi realizada a extração do RNA com o *Kit Qiagen RNeasy FFPE* para extração do RNA, de acordo com instruções do fabricante, consistindo basicamente de digestão com proteinase K (para remover as ligações cruzadas do RNA com proteínas), isolamento do RNA, incubação com DNase e purificação do RNA.

A quantificação de RNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se o *Nanodrop®*, através para cálculo da concentração de RNA em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A fórmula aplicada foi: $[\text{RNA}] = A_{260} \times F_c \times f_d$, onde A_{260} corresponde ao valor de absorbância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; F_c corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; f_d corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o resultado é a concentração em $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorbância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$.

O kit *RNA 600 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 do RNA com tamanho > 200 nucleotídeos.

O kit utilizado foi o *Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip* (Figura 2A), processado de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 2: Imagem representativa do *GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip* (Affymetrix®) utilizado para análise global de miRNA (A) e *GeneAtlas* (Affymetrix®) (B).



Fonte: LUCAS, F.A., 2020.

2.3 Análise do miRNA

As amostras foram marcadas com o *FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kits*, hibridizadas com o *GeneAtlas® Hybridization, Wash, and Stain Kit* for miRNA Arrays e escaneadas no equipamento *GeneAtlas (Affymetrix®)* (Figura 2B).

Para identificar os genes diferencialmente expressos a partir do microarranjo, utilizou-se o software *Transcriptome Analysis Console (TAC)* (*Affymetrix®*), empregando-se a análise estatística ANOVA (*fold change* $\pm 1,5$; FDR corrigido $P < 0,05$). Para identificar os genes diferencialmente expressos a partir do *TruSeq® Targeted RNA expression*, utilizou-se o aplicativo *TruSeq Targeted RNA v1.1* no *BaseSpace (Illumina®, San Diego, CA)*. Após a desmultiplexação e a geração de arquivos FASTQ, as leituras de cada amostra foram alinhadas às referências especificadas no manifesto usando o algoritmo Smith-Waterman que alinha todas as sequências e produz arquivos de destino que contêm contagens replicadas alinhadas brutas para cada transcrito. Em seguida foi realizada análise de expressão diferencial, na qual foram calculados os valores de normalização da profundidade do sequenciamento, estimativa de variância e p valores (*fold change* $\pm 1,5$ P ajustados $< 0,05$ usando o método Benjamini-Hochberg).

Visto a escassez de banco de dados contendo o genoma de referência equino, foi utilizado para predição de alvos o ortólogo humano do eca-miRNA. A sequência de nucleotídeos do miRNA foi obtida através da plataforma online “miRBase” (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0012682). Através do BLASTN, foi obtido o ortólogo humano.

A predição de alvos com o ortólogo humano de cada miRNA foi realizada com a plataforma online *TargetScanHuman* (Release 7.2: March 2018, Agarwal et al., 2015 - http://www.targetscan.org/vert_72/).

A análise de vias foi realizada utilizando os genes-alvo na plataforma online *Enrichr* (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>).

3 RESULTADOS

Dos 360 miRNA analisados pelo *strip* utilizado no processamento das amostras (tecido cutâneo parafinado tratado ou não), baseando-se na comparação

entre os grupos tratamento e controle das feridas metacárpicas, três miRNAs equinos diferencialmente expressos foram identificados: *eca-miR-450c*, *eca-miR-98* e *eca-miR-487b*, todos supra-regulados no grupo tratamento.

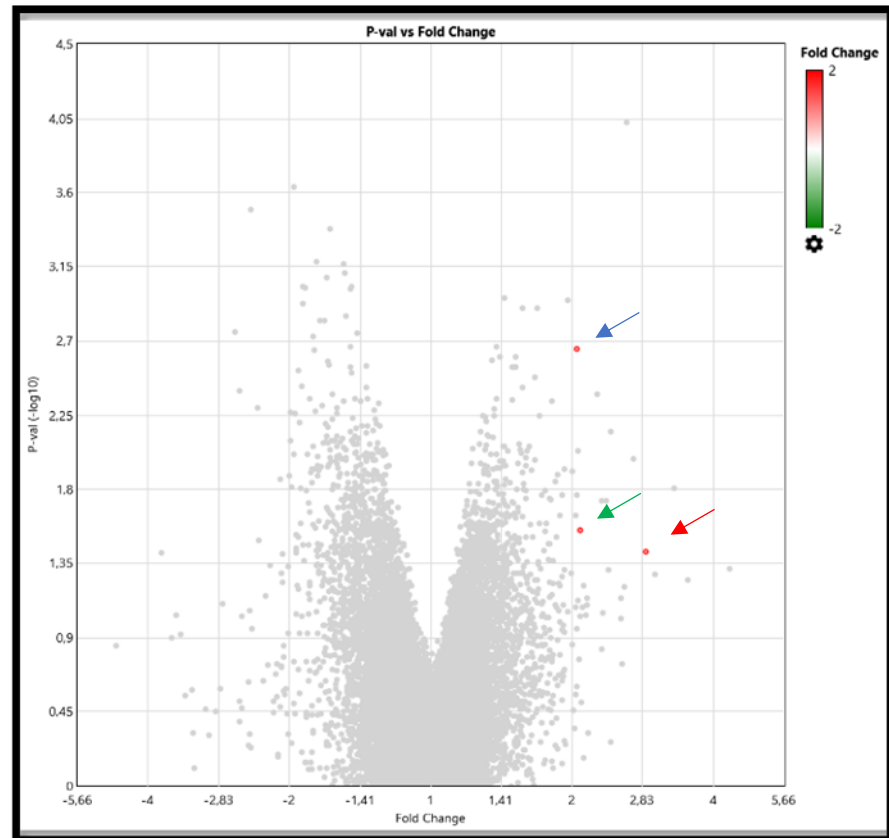
A Tabela 1 apresenta a média e desvio-padrão, *fold change* e o valor de P da expressão de miRNAs supra-regulados, na comparação dos grupos tratamento e controle.

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

Ferida	miRNA	Ortólogo humano	Média e desvio-padrão do grupo (log2)		Fold Change	P
			Tratamento	Controle		
Metacarpo	<i>eca-miR-450c</i>	-	3,88 ± 0,69	2,84 ± 0,11	2,05	0,0022
	<i>eca-miR-98</i>	<i>hsa-miR-98-5p</i>	5,14 ± 0,66	4,08 ± 0,57	2,08	0,0280
	<i>eca-miR-487b</i>	<i>hsa-miR-487b-3p</i>	3,93 ± 0,58	2,41 ± 0,66	2,87	0,0378

A Figura 3 mostra, graficamente, a confirmação dos miRNAs expressos em feridas de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba.

Figura 3. Volcano plot (Valor de P x Fold change) da expressão dos miRNAs quando comparados os grupos tratamento e controle das feridas metacárpicas. Os pontos vermelhos representam graficamente os miRNAs *eca-miR-450c* (seta azul), *eca-miR-98* (seta verde) e *eca-miR-487b* (seta vermelha), diferencialmente expressos no grupo tratamento.



Após consulta junto às bases de dados genômicos (*miRBase*), verificou-se que os miRNAs *eca-miR-450c*, *eca-miR-98* e *eca-miR-487b* não estão descritos e nem correlacionados com a cicatrização de feridas nos equídeos, o que nos permite inferir de que se trata da primeira descrição de miRNAs durante o processo cicatricial. No entanto, ao se realizar o estudo de ortologia com a espécie humana, foi possível identificar possíveis funções e vias metabólicas envolvidas na doença, dada à alta conservação do genoma entre as espécies. Foram identificados os miRNAs *hsa-miR-98-5p* e *hsa-miR-487b-3p*, ortólogos humanos dos miRNAs equinos *eca-miR-98* e *eca-miR-487b*, respectivamente. Por serem ortólogos idênticos, de genes-alvos foi identificada no programa *Transcriptome Analysis Console* (*appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific*). Após a conclusão da análise verificou-se a apresentação

de 740 genes alvo para o *hsa-miR-98-5p* e 16 genes alvo para o *hsa-miR-487b-3p*. Para o miRNA *eca-miR-450c* não foi possível a identificação do ortólogo humano.

Quanto à predição de possíveis genes alvo envolvidos na cicatrização de feridas em equinos, observou-se que os dois miRNAs identificados por ortologia humana podem regular milhares de genes alvo, segundo as plataformas de enriquecimento de vias biológicas. No entanto, optou-se em analisar aquelas que possivelmente estivessem correlacionadas às vias de sinalização para a angiogênese, proliferação celular ou a regulação do ciclo celular.

4 DISCUSSÃO

Lucas e colaboradores (2017) avaliaram a cicatrização de feridas em parte distal de membros de equino utilizando o óleo de copaíba a 10%. Apesar de não obter diferença estatística nas taxas de contração das feridas, as feridas que receberam o tratamento com o óleo, se comparado ao grupo controle apresentavam melhor aspecto visual clínico. Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

A fixação de rotina em formalina a 10% de biópsias ainda é o tipo mais comum de arquivo de amostras em serviços de patologia. A recuperação e amplificação do ácido nucleico do material FFPE é de crescente interesse por estudos piloto e retrospectivos para uma variedade de objetivos (BOOS et al., 2019). Estudos apontam a possibilidade de extração de RNA de amostras FFPE para expressão gênica, inclusive microarranjo (ABDUEVA et al., 2010; MUSELLA et al., 2015; RIBEIRO-SILVA; GARCIA, 2008). O RNA isolado a partir de amostras deste tipo era parcialmente degradado, limitando a análise transcriptômica de tecidos parafinados (FARRAGHER et al., 2008; GILBERT et al., 2007) num passado recente.

Atualmente a análise transcriptômica de tecidos FFPE usando microarranjo torna-se possível, e quase comparável a tecidos congelados frescos (FRANK et al., 2007). Nesta pesquisa foi possível a realização do transcriptoma de miRNAs a partir de amostras FFPE anteriormente processadas e armazenadas há sete anos.

Em estudo realizado com amostras de tecido FFPE, usando apenas fragmentos cirúrgicos que foram fixados de uma a duas horas após a exérese e submetidos a uma fixação com formalina com duração máxima de 72 horas, os pesquisadores foram capazes de extrair e analisar com sucesso o RNA de mais de

250 blocos de tecido tumoral FFPE, incluindo amostras com mais de 20 anos de armazenamento. Sugeriram que o tempo embebido em parafina não afetou o RNA, apesar da ressalva que blocos de parafina sempre foram lacrados após o preparo das lâminas, minimizando o risco de oxidação do tecido (SPECHT et al., 2001). Mais uma vez ressaltando a importância do correto armazenamento dos blocos, nossa pesquisa foi satisfatória quanto a esse mesmo resultado.

A etapa de desparafinização com xilol é citada pela maioria dos kits específicos para amostras FFPE é controversa pois ela não é capaz de retirar toda a parafina da amostra, resultando em RNA de qualidade inferior. Na técnica modificada por Belder et al (2016), utilizada no presente estudo, a mesma quantidade de amostra de tecido FFPE sugerida pelo fabricante do kit de extração foi estabelecida, porém em um recipiente maior volume adicional de xilol (5mL). Acreditamos que essa maior quantidade de xilol em um recipiente maior, promoveu a remoção da parafina mais efetivamente, 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 RNA desenvolvidos requerem apenas 300 pares de bases. Dessa maneira, com o RNA extraído de material parafinado é possível se realizar a maioria das técnicas em 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). Desta forma, a análise métrica DV200 para calcular a porcentagem dos fragmentos do RNA com tamanho > 200 nucleotídeos para qualificação dos RNAs extraídos das amostras FFPE foi utilizada nesta pesquisa.

Os miRNAs representam uma importante classe na regulação de genes. Com este estudo obtivemos a análise do transcriptoma de 360 miRNAs de feridas tratadas ou não com óleo de copaíba a 10% aos 21 dias de cicatrização. Esse número exato foi possível mediante o *strip* utilizado para as análises desta pesquisa. A abordagem metodológica empregada permitiu selecionar os miRNAs com transcrição regulada diferencialmente para cima (expressão aumentada ou supra-regulados) ou para baixo (expressão diminuída ou infra-regulados) entre o grupo controle e o grupo que recebeu o óleo de copaíba a 10%.

Este estudo é a primeira descrição da identificação de miRNA em feridas metacarpianas de equinos tratadas ou não com óleo de copaíba a 10%.

Nesta pesquisa, os miRNA expressos foram identificados através do uso de microarranjos que detectaram três miRNAs (*eca-miR-450c*, *eca-miR-98* e *eca-miR-487b*) diferencialmente expressos em amostras FFPE de feridas cutâneas de equinos, considerando um *fold change* de 1,5.

A maioria dos trabalhos sobre o assunto é na medicina humana, sobretudo em neoplasias. Desta forma, buscamos ortólogos humanos para discussão com os *eca-miR*, os miRNA equinos, encontrados na pesquisa. Dentre os diferencialmente expressos nos resultados obtidos neste estudo, para o *eca-miR-450c* não foi encontrado nenhum ortólogo humano, necessitando, portanto, de pesquisas futuras para desvendar sua ortologia e funções.

Sabe-se que o *miR-98-5p* (ortólogo idêntico humano ao encontrado) desempenha papel importante na proliferação de células cancerosas, apoptose e metástase, inibe a angiogênese e a invasão tumoral (SIRAGAM et al., 2012) em alguns tipos de cânceres já referenciados na literatura, tais como adenocarcinoma do ducto pancreático (FU et al., 2018), câncer no epitélio ovariano (WANG et al., 2018) e carcinoma papilífero de tireoide (QIU et al., 2020), câncer pulmonar (WU et al., 2019) e carcinoma hepatocelular (JIANG et al., 2017).

Os níveis aumentados de *miR-98-5p* controlam alguns genes alvo responsáveis por induzir apoptose e migração celular, além de reduzir a proliferação celular. Essa redução dos processos apoptóticos pode interferir na fisiologia tecidual orquestrada ou no reparo de feridas. A migração celular alterada levaria ao retardo do processo cicatricial em diabéticos (BALTZIS; ELEFThERIADOU; VEVES, 2014; GREENHALGH, 1998; KHAN et al., 2019). Um dos pontos que buscamos evitar ao tratar uma ferida em equinos é evitar o desenvolvimento do tecido de granulação exuberante, muito comum principalmente em região distal de membros. Com o uso do óleo de copaíba a 10% observou-se cicatrização das feridas experimentais distais dos animais utilizados sem ocorrência de tecido de granulação exuberante.

Um dos genes alvos para *miR-98-5p* é o CDKN1A, p21 ou inibidor da quinase dependente de ciclina 1 (LÓPEZ-HUERTAS et al., 2019). Constitui um regulador crítico da proliferação celular, diferenciação e senescência em células-tronco mesenquimais, que se acredita serem células progenitoras cruciais para o reparo de tecidos (MENTARA et al., 2010; STAPPENBECK; MIYOSHI, 2009). Durante a lesão cutânea, a regulação positiva de p21 retarda a fase de proliferação e pode induzir inflamação prolongada e promover cicatrizes (BOND et al., 2008). Nos equinos

o efeito dessa regulação positiva poderia ser o tecido de granulação exuberante, que não permite o processo cicatricial termine, necessitando da intervenção veterinária.

Com o intuito de determinar a expressão de p21 durante a cicatrização de feridas, foram realizadas feridas cutâneas em camundongos e biopsias da ferida e de pele coletadas e preservadas para análise por qPCR e análise de Western blot. A expressão de p21 foi regulada positivamente em feridas três dias após o ferimento em comparação com a pele saudável, sugerindo que a p21 é fortemente regulada positivamente para interromper o ciclo celular (JIANG et al., 2020).

Em estudo com ratos e idosos humanos, constatou-se que a inibição transitória e localizada de p21 pode promover a cicatrização de feridas em indivíduos idosos que muitas vezes sofrem de feridas de difícil tratamento com formação de cicatriz extensa (JIANG et al., 2020). Tais dados sugerem evidências sobre a relação da supra regulação do *miR-98-5p* com o controle da proliferação celular e benefícios na cicatrização das feridas que receberam o óleo de copaíba a 10%.

Após a lesão tecidual, nota-se hipóxia devido ruptura vascular (BOTUSAN et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2008; SCHREML et al., 2010). O oxigênio necessário para o início do reparo depende da angiogênese e revascularização e, caso isso não ocorra, há prejuízo na cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010). A resposta genética à hipóxia ocorre pela via proteína do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF1 α), ativando genes responsáveis pela angiogênese e a proliferação celular. O VEGF é o principal gene alvo e, durante a fase proliferativa da cicatrização, sendo uma importante proteína estimuladora da angiogênese no tecido de granulação. (LEE et al., 2004; SEMENZA, 2002). O HIF1 α também é uma proteína que induz a transcrição do inibidor da quinase dependente da p21 (CHO et al., 2008). Em estudo de feridas cutâneas de equinos, constatou-se expressão desta proteína por queratinócitos e o seu envolvimento na homeostase epitelial por meio do controle da proliferação celular pela p21 (DESCHENE et al., 2011). Partindo desta assertiva, é possível prever que a super expressão do *miR-98-5p* das feridas tratadas com óleo de copaíba a 10%, regule a p21 e HIF1 α e, assim, possa controlar a formação do tecido de granulação excessivo, comumente observado na cicatrização de feridas da região do metacarpo nesta espécie.

Sabe-se ainda que o *miR-98-5p* tem como gene alvo o grupo Wnt (WEISSMAN et al., 2020), que tem a via de sinalização do tipo Wingless (Wnt), desempenhando papel em diversas funções celulares, incluindo proliferação,

diferenciação, apoptose, sobrevivência, migração e polaridade, regulando múltiplas cascatas de sinalização intracelular (LOGAN; NUSSE, 2004; NUSSE, 2005).

A via de sinalização Wnt é dividida em duas subclasses: a via canônica (via Wnt / β -catenina) e a via não canônica, onde a via Wnt / β -catenina favorece direta ou indiretamente a cicatrização de feridas. (ZHANG et al., 2009).

A via de sinalização da β -catenina desempenha um papel crucial nos processos de regulação, diferenciação, proliferação e morte celular (OCHOA-HERNÁNDEZ et al., 2012). Encontra-se elevada nas células mesenquimais durante a fase proliferativa e acredita-se que regule a taxa de proliferação de fibroblastos dérmicos, motilidade e invasão (CHEON et al., 2005, 2002). A fase proliferativa da cicatrização de feridas envolve epitelização, angiogênese e uma formação de matriz provisória. Plaquetas e macrófagos ativados estimulam a proliferação epitelial por meio do fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e do fator de crescimento epidérmico EGF (GROTENDORST et al., 1989).

Estudos demonstrando o envolvimento de via de sinalização mediada pelo Wnt5a, com inibição focal da proliferação na patogênese do quelóide, desencadeada por um processo inflamatório (IGOTA et al., 2013; MIYOSHI et al., 2012). Os transtornos fibroproliferativos, caracterizados pela deposição de Matriz Extra Celular (ECM) excessiva ou tecido de granulação, estão associados a inflamação crônica, proliferação celular e, sob algumas condições, falha no fechamento da ferida. O tecido fibroproliferativo se desenvolve exclusivamente em humanos, como cicatrizes hipertróficas e quelóides, e nos membros distais de cavalos, chamado de tecido de granulação exuberante (TGE). Quelóides geralmente se desenvolvem após a reepitelização, enquanto o TGE é caracterizado pela reepitelização retardada (HARMAN; THEORET; WALLE, 2021). Essa pode ser uma importante via para análises futuras nas pesquisas sobre cicatrização na espécie equina, inclusive com óleo de copaíba, o qual poderia estimular ou reduzir alguma glicoproteína da família Wnt, uma vez que o grupo que recebeu o óleo de copaíba a 10% apresentou *miR-98-5p* supra regulado.

A hipótese de que miRNAs possuem papel ativo e crucial como condutores ou silenciadores de genes relacionados a processos de iniciação e progressão neoplásica é cada vez mais evidente. O *miR-487b-3p* (ortólogo humano encontrado em nosso estudo) está envolvido na supressão de câncer de cólon em humanos (YI

et al., 2017), próstata (DANIEL et al., 2017), osteosarcoma (CHENG et al., 2020), além de regular negativamente a osteogênese (JOHN; PRAKASH; SINGH, 2019).

Cheng e colaboradores (2020) sugerem que supressão do osteossarcoma pelo *miR-487b-3p*, indicando este miRNA como uma nova estratégia para inibir a metástase tumoral e quimiorresistência nesta neoplasia.

Em nosso estudo observou-se expressão aumentada deste miRNA nas feridas tratadas com óleo de copaíba a 10%, as quais tiveram evidências clínicas de melhor cicatrização e menor formação de tecido de granulação. Desta forma, podemos imputar ao óleo de copaíba o aumento da expressão do *miR-467-3p* nas feridas que receberam o óleo, resultando em controle do tecido de granulação exuberante, comum na região de membros dos equinos.

Resultados obtidos com a análise de miRNA em pacientes com reação alérgica, mostraram resultados supra expressos de *miR-487b-3p*, e correlacionaram com os efeitos dermatológicos (NUÑEZ-BORQUE et al., 2021), associando isso a algum papel na inflamação durante a fase anafilática, baseando-se nos achados de outros autores (LIU; LIAO; LIU, 2018; YAMAZUMI et al., 2016). A pele é o órgão predominantemente afetado durante a anafilaxia, pela urticária e angioedema na grande maioria dos pacientes (RING; BEHRENDT; WECK, 2010). Com o envolvimento da via de sinalização da interleucina-9 (IL-9), citocina pró-inflamatória liberada pelos mastócitos que induz à inflamação e remodelação epitelial (KAKINOKI et al., 2020). Como os processos cicatriciais são bem elucidados e no decorrer desse desenvolvimento ocorre a inflamação local, o *miR-487b-3p* poderia estar envolvido no processo pela ativação da via de IL-9 liberada pelos mastócitos locais e então início da fase inflamatória, seguida de reepitelização.

O silenciamento de genes baseado em miRNA desempenha um papel crítico na resposta de reparo do tecido após o ferimento. A capacidade de manipular terapêuticamente a expressão de miRNA por meio da entrega sistêmica ou local de indutores ou inibidores de miRNA despertou entusiasmo sobre o potencial terapêutico dos miRNAs para feridas que não cicatrizam. (BANERJEE; SEN, 2015). Esse pode ser um ponto de apoio futuro, utilizando-se os achados dos miRNAs super expressos nesta pesquisa, para o desenvolvimento de princípios ativos capazes de realizar esse silenciamento e auxiliar no processo cicatricial e evitar a formação de tecidos de granulação exuberantes.

5 CONCLUSÃO

Com a metodologia empregada nesta pesquisa foi possível a extração de miRNAs de amostras FFPE a partir de biopsias em feridas da região do metacarpo de equinos tratadas com óleo de copaíba a 10%.

Aos 21 dias, as feridas que receberam o tratamento apresentaram três miRNA diferencialmente expressos: *eca-miR-450c*, *eca-miR-98* e *eca-miR-487b* e, por meio de seus correspondentes ortólogos humanos, o *miR-98-5p* e o *miR-487b-3p*, concluímos sugerimos o envolvimento dos mesmos durante a cicatrização.

Esse estudo é pioneiro no transcriptoma de miRNA de feridas metacárpicas de equinos tratados com óleo de copaíba a 10% e, pesquisas futuras são necessárias para confirmar o papel específico desses miRNA durante a fase cicatricial de feridas nesta espécie.

REFERÊNCIAS

ABDUEVA, D. et al. Quantitative Expression Profiling in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples by Affymetrix Microarrays. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 4, p. 409–417, 1 jul. 2010.

ADZICK, N. S.; LORENZ, H. P. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. **Annals of Surgery**, v. 220, n. 1, p. 10, 1994.

ALFORD, C. G.; CALDWELL, F. J.; HANSON, R. Equine distal limb wounds: New and emerging treatments. **Compendium: Continuing Education**, p. E1–E6, jul. 2012.

ALLEN, S. et al. Wounds in UK primary-care equine practice: prevalence, clinical presentation, management, outcomes and risk factors for occurrence. **Equine Veterinary Journal**, v. 52, n. S54, p. 13–14, out. 2020.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature** 2004 **431:7006**, v. 431, n. 7006, p. 350–355, 15 set. 2004.

AMORIM, J. L. et al. Wound healing properties of *Copaifera paupera* in diabetic mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0187380, 1 out. 2017.

ARAUJO, A. L. et al. Effects of topical application of pure and ozonized andiroba oil on experimentally induced wounds in horses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 66–74, 19 maio 2017.

ARROYO, J. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 5003–5008, 22 mar. 2011.

BALTZIS, D.; ELEFThERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. **Advances in therapy**, v. 31, n. 8, p. 817–836, 1 ago. 2014.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 31, n. 6, p. 674–686, 21 mar. 2005.

BELDER, N. et al. Optimization of gene expression microarray protocol for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Genomics Data**, v. 7, p. 303, 1 mar. 2016.

BOND, J. S. et al. Maturation of the human scar: An observational study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 121, n. 5, p. 1650–1658, maio 2008.

BOOS, G. et al. Optimization of RNA extraction protocol for long-term archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues of horses. **Experimental and molecular pathology**, v. 110, 1 out. 2019.

BOOTH, T. M.; KNOTTENBELT, D. C. Distal limb casts in equine wound management. **Equine Veterinary Education**, v. 11, n. 5, p. 273–280, 1999.

BOSCARATO, A. G. et al. Use of Calender Extract Cream in Equine Lacerate Wound. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, n. 0, p. 501, 2020.

BOTUSAN, I. R. et al. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 49, p. 19426–19431, 9 dez. 2008.

BOUDRA, R.; RAMSEY, M. R. Focus: Skin: Understanding Transcriptional Networks Regulating Initiation of Cutaneous Wound Healing. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 93, n. 1, p. 161, 1 mar. 2020.

BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. **Comparative Haematology International 1998 8:1**, v. 8, n. 1, p. 16–20, 1998.

CARELLA, A. et al. Circulating MicroRNAs as Novel Disease Biomarkers: Can They be Applied in Daily Clinical Practice? **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11–13, 2017.

CHENG, M. et al. MicroRNA-487b-3p inhibits osteosarcoma chemoresistance and metastasis by targeting ALDH1A3. **Oncology Reports**, v. 44, n. 6, p. 2691–2700, 1 dez. 2020.

CHEON, S. et al. Prolonged β -catenin stabilization and tcf-dependent transcriptional activation in hyperplastic cutaneous wounds. **Laboratory Investigation** 2005 85:3, v. 85, n. 3, p. 416–425, 17 jan. 2005.

CHEON, S. S. et al. β -Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 10, p. 6973–6978, 14 maio 2002.

CHO, Y. S. et al. HIF-1 α controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 2, p. 323–333, 1 fev. 2008.

CHOI, B.-M. et al. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor- β 1 oligodeoxynucleotides. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. 144–150, 1 abr. 1996.

CINES, D. B. et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527–3561, 15 maio 1998.

CLARK, R. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **The American journal of the medical sciences**, v. 306, n. 1, p. 42–48, 1993.

COCHRANE, C. A.; PAIN, R.; KNOTTENBELT, D. C. In-vitro wound contraction in the horse: differences between body and limb wounds. **Wounds - A compendium of clinical research and practice**, v. 15, n. 6, p. 175–181, 2003.

CREEMERS, E.; TIJSEN, A.; PINTO, Y. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? **Circulation research**, v. 110, n. 3, p. 483–495, 3 fev. 2012.

DANIEL, R. et al. A Panel of MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for the Identification of Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, Vol. 18, Page 1281, v. 18, n. 6, p. 1281, 16 jun. 2017.

DAS, P. J. et al. Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56535, 11 fev. 2013.

DESCHENE, K. et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 250–259, 1 mar. 2011.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 283–289, 2004.

DOUGHERTY, E. R. Small sample issues for microarray-based classification. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 1, p. 28–34, 1 fev. 2001.

EGGLESTON, R. B. Wound Management: Wounds with Special Challenges. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 511–538, 1 dez. 2018.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 26, n. 2, p. 31–37, 1 fev. 2008.

FARIA, N. DE A. A. [UNESP]. Aspectos morfométricos e histológicos do tegumento de equinos das raças Árabe e Quarto de Milha. **Aleph**, p. viii, 52 f. : il., 10 dez. 2009.

FARRAGHER, S. M. et al. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. **Histochemistry and Cell Biology** 2008 **130:3**, v. 130, n. 3, p. 435–445, 5 ago. 2008.

FILIPPO, P. A. DI et al. Effects of pure and ozonated sunflower seed oil (*Helianthus annuus*) on hypergranulation tissue formation, infection and healing of equine lower limb wounds. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 1, p. e113520–e113520, 8 dez. 2020.

FRANK, M. et al. Global gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples: a comparison to snap-frozen material using oligonucleotide microarrays. **Virchows Archiv** 2007 **450:6**, v. 450, n. 6, p. 699–711, 4 maio 2007.

FREES, K. E. Equine Practice on Wound Management | Elsevier Enhanced Reader. **Vet Clin Equine**, v. 34, p. 473–484, 2018.

FU, Y. et al. Downregulated miR-98-5p promotes PDAC proliferation and metastasis by reversely regulating MAP4K4. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 37, n. 1, 3 jul. 2018.

GAUGHAN, E. M. Diagnostic Approaches to Understanding Equine Limb Wounds. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 461–471, 1 dez. 2018.

GILBERT, M. T. P. et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues–Which Methods Are Useful When? **PLOS ONE**, v. 2, n. 6, p. e537, 2007.

GIT, A. et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 5, p. 991–1006, maio 2010.

GOUVEIA, G. R. et al. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 649–654, dez. 2011.

GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 30, n. 9, p. 1019–1030, set. 1998.

GROTENDORST, G. R. et al. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 139, n. 3, p. 617–623, 1 jun. 1989.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing: <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>, v. 89, n. 3, p. 219–229, 5 fev. 2010.

HARMAN, R. M.; THEORET, C. L.; WALLE, G. R. VAN DE. The Horse as a Model for the Study of Cutaneous Wound Healing. <https://home.liebertpub.com/wound>, v. 10, n. 7, p. 381–399, 26 maio 2021.

HÉBERT, S. S.; DE STROOPER, B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 199–206, abr. 2009.

HEIDARI, M. et al. Brain iron accumulation affects myelin-related molecular systems implicated in a rare neurogenetic disease family with neuropsychiatric features. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 11, p. 1599–1607, 1 nov. 2016.

HESS, C. T. Skin care basics . **Advances in Skin & Wound Care**, v. 13, n. 3, p. 127–128, maio 2000.

IGOTA, S. et al. Identification and Characterization of Wnt Signaling Pathway in Keloid Pathogenesis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 344, 15 fev. 2013.

JACOBS, K. A. et al. Comparative Aspects of the Healing of Excisional Wounds on the Leg and Body of Horses. **Veterinary Surgery**, v. 13, n. 2, p. 83–90, 1984.

JIANG, D. et al. Local and transient inhibition of p21 expression ameliorates age-

related delayed wound healing. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 28, n. 1, p. 49–60, 1 jan. 2020.

JIANG, T. et al. MicroRNA-98-5p Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma via Targeting IGF2BP1. **Oncology Research**, v. 25, n. 7, p. 1117, 2017.

JOGLEKAR, M. et al. Circulating microRNA Biomarkers of Diabetic Retinopathy. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 22–24, 1 jan. 2016.

JOHN, A. A.; PRAKASH, R.; SINGH, D. miR-487b-3p impairs osteoblastogenesis by targeting Notch-regulated ankyrin-repeat protein (Nrarp). **Journal of Endocrinology**, v. 241, n. 3, p. 249–263, 1 jun. 2019.

JØRGENSEN, E. et al. TECHNOLOGY ADVANCES An Equine Wound Model to Study Effects of Bacterial Aggregates on Wound Healing. **ADVANCES IN WOUND CARE**, v. 8, n. 10, 2017.

JOSE, V. 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, 1 ago. 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 13 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KAKINOKI, A. et al. Establishment and Characterization of a Murine Mucosal Mast Cell Culture Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 1 jan. 2020.

KAMEL, R. A. et al. Tissue Engineering of Skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533–555, 1 set. 2013.

KAMUS, L.; THEORET, C. Choosing the Best Approach to Wound Management and Closure. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 499–

509, 2018.

KHAN, R. et al. Circulatory miR-98-5p levels are deregulated during diabetes and it inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting PPP1R15B in keratinocytes. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1673117>, v. 17, n. 2, p. 188–201, 1 fev. 2019.

KIRSNER, R. S.; EAGLSTEIN, W. H. The Wound Healing Process. **Dermatologic Clinics**, v. 11, n. 4, p. 629–640, 1 out. 1993.

KNOTTENBELT, D. C. Equine wound management: Are there significant differences in healing at different sites on the body? **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 273–290, 1997.

LAWRENCE, W. T. Physiology of the Acute Wound. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 25, n. 3, p. 321–340, 1 jul. 1998.

LEE, J.-W. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. **Experimental & Molecular Medicine** 2004 36:1, v. 36, n. 1, p. 1–12, 1 fev. 2004.

LEISE, B. S. Topical Wound Medications. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 485–498, 2018.

LIU, C.-G. et al. MicroRNA expression profiling using microarrays. **Nature Protocols** 2008 3:4, v. 3, n. 4, p. 563–578, 13 mar. 2008.

LIU, H. C.; LIAO, Y.; LIU, C. Q. MiR-487b mitigates allergic rhinitis through inhibition of the IL-33/ST2 signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 23, p. 8076–8083, 2018.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>, v. 20, p. 781–810, 8 out. 2004.

LÓPEZ-HUERTAS, M. R. et al. Selective miRNA Modulation Fails to Activate HIV Replication in In Vitro Latency Models. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 17, p. 323–336, 6 set. 2019.

LUCAS, F. DE A. et al. Copaiba oil in experimental wound healing in horses. **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, 6 mar. 2017.

MAHMOUD ALI, M.; RADAD, K. Cod liver oil/honey mixture: An effective treatment of equine complicated lower leg wounds. **Veterinary World**, v. 4, n. 7, p. 304–310, 2011.

MAJNO, G.; SHEA, S. M.; LEVENTHAL, M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. **The Journal of cell biology**, v. 42, n. 3, p. 647–672, 1969.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biology** 2011 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–9, 31 maio 2011.

MARTINS, P. S. et al. COMPARAÇÃO ENTRE FITOTERÁPICOS DE USO TÓPICO NA CICATRIZAÇÃO DE PELE EM EQÜINOS (Comparison between phytotherapies on equine wound healing). **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 1–7, 2003.

MASSON, D. S. et al. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. SUPPL. 1, p. 664–669, 2013.

MCHEIK, J. N. et al. Epidermal Healing in Burns: Autologous Keratinocyte Transplantation as a Standard Procedure: Update and Perspective. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 2, n. 9, 2014.

MENTARA, B. J. et al. p21cip/WAF is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 12, p. 4877–4888, 1 dez. 2010.

MIYOSHI, H. et al. Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt

regeneration after tissue injury. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 108–113, 5 out. 2012.

MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing: An overview. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 30, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2003.

MONTES, L. V et al. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza online**, v. 7, n. 2, p. 61–67, 2009.

MUSELLA, V. 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, 6 abr. 2015.

MUSTOE, T. A.; O'SHAUGHNESSY, K.; KLOETERS, O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, jun. 2006.

NASALAPURE, A. V. et al. Tissue Engineering of Skin: a Review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 31, n. 2, p. 69–80, 2017.

NUÑEZ-BORQUE, E. et al. Increased miR-21-3p and miR-487b-3p serum levels during anaphylactic reaction in food allergic children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1296–1306, 1 ago. 2021.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research** 2005 **15:1**, v. 15, n. 1, p. 28–32, 2005.

O'KANE, S. Wound remodelling and scarring. **Journal of wound care**, v. 11, n. 8, p. 296–299, 2002.

OCHOA-HERNÁNDEZ, A. B. et al. Wnt- β -catenina signaling pathway and its relationship with cancer. **Cirugía y Cirujanos**, v. 80, n. 4, p. 389–398, 2012.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from

Copaifera langsdorffii in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 737–739, 1 dez. 2002.

PAIVA, L. A. F. **Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da Copaifera langsdorffii Desf. (COPAÍBA) e de seu constituinte diterpênico ácido kaurenóico nos modelos experimentais de inflamação intestinal**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceara, 2004.

PETER, F. W. et al. The effect of wound ointments on tissue microcirculation and leucocyte behaviour. **Clinical and experimental dermatology**, v. 27, n. 1, p. 51–55, 2002.

PIRIZ, M. A. et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: Uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 628–636, 2014.

QIU, K. et al. miR-98-5p promotes apoptosis and inhibits migration and cell growth in papillary thyroid carcinoma through Bax/Caspase-3 by HMGA2. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 2, 1 fev. 2020.

RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. **Clinics in plastic surgery**, v. 32, n. 2, p. 195–208, 2005.

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, n. 2, p. 123–130, 2008.

RING, J.; BEHRENDT, H.; WECK, A. DE. History and Classification of Anaphylaxis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 95, p. 1–11, 2010.

ROBSON, M.; STEED, D.; FRANZ, M. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current problems in surgery**, v. 38, n.

2, p. A1, 2001.

RODRIGUEZ, P. G. et al. The Role of Oxygen in Wound Healing: A Review of the Literature. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 9, p. 1159–1169, 1 set. 2008.

SANTOS, A. O. DOS et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

SCHREML, S. et al. Oxygen in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 2, p. 257–268, 1 ago. 2010.

SCHULTZE, J.; BEYER, M. Myelopoiesis Reloaded: Single-Cell Transcriptomics Leads the Way. **Immunity**, v. 44, n. 1, p. 18–20, 19 jan. 2016.

SCHWARTZ, A. J. et al. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1564>, v. 63, n. 11, p. 1564–1570, 7 dez. 2005.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Chapter 1 - Structure and Function of the skin. In: SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. (Eds.). . **Equine Dermatology**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Saunders, 2011. p. 34.

SELLS, P. D. et al. Pack wounds of donkeys and mules in the Northern High Atlas and lowlands of Morocco. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 3, p. 219–226, 1 abr. 2010.

SEMENZA, G. L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5–6, p. 993–998, 1 set. 2002.

SHAH, R. G.; PIERCE, M. C.; SILVER, F. H. Morphomechanics of dermis-A method for non-destructive testing of collagenous tissues. **Skin Research and Technology**, v. 23, n. 3, p. 399–406, 1 ago. 2017.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.

SINGER, E. R.; SAXBY, F.; FRENCH, N. P. A retrospective case-control study of horse falls in the sport of horse trials and three-day eventing. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 139–145, 1 mar. 2003.

SIRAGAM, V. et al. MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11. **Oncotarget**, v. 3, n. 11, p. 1370–1385, 2012.

SØRENSEN, M. A. et al. Regional disturbances in blood flow and metabolism in equine limb wound healing with formation of exuberant granulation tissue. 2014.

SOTIROPOULOU, P. A.; BLANPAIN, C. Development and Homeostasis of the Skin Epidermis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 7, p. a008383, 1 jul. 2012.

SPECHT, K. et al. Quantitative Gene Expression Analysis in Microdissected Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p. 419–429, 1 fev. 2001.

STAPPENBECK, T. S.; MIYOSHI, H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1666–1669, 26 jun. 2009.

STASHAK, T. S.; THEORET, C. L. **Equine Wound Management**. 2. ed. Iowa: [s.n.]. STASZEL, T. et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 121, n. 10, p. 361–367, 2011.

STIERMBERG, J. et al. The Role of Thrombin and Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP-508) in Initiation of Tissue Repair. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 70, n. 07, p. 158–162, 3 jul. 2018.

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nature reviews. Gastroenterology**

& **hepatology**, v. 10, n. 9, p. 542–552, set. 2013.

THEORET, C.; BOLWELL, C.; RILEY, C. A cross-sectional survey on wounds in horses in New Zealand. <https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1091396>, v. 64, n. 2, p. 90–94, 3 mar. 2015.

THEORET, C. L. et al. Expression of Transforming Growth Factor β 1, β 3, and Basic Fibroblast Growth Factor in Full-Thickness Skin Wounds of Equine Limbs and Thorax. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 3, p. 269–277, 1 maio 2001.

THEORET, C. L. et al. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study. **Veterinary surgery : VS**, v. 42, n. 7, p. 783–789, out. 2013.

TOBOUTI, P. L. et al. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93–99, 2017.

TODHUNTER, R. J. et al. Structure of equine type I and type II collagens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 3, p. 425–431, 1 mar. 1994.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, jun. 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms: **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 1 out. 2009.

WAKURI, H. et al. Microscopic Anatomy of the Equine Skin with Special Reference to the Dermis. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**, v. 72, n. 2–3, p. 177–183, 21 ago. 1995.

WANG, Y. et al. miR-98-5p contributes to cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer by suppressing miR-152 biogenesis via targeting Dicer1. **Cell Death & Disease** **2018** **9:5**, v. 9, n. 5, p. 1–17, 18 abr. 2018.

WEISSMAN, R. et al. Supplementary Materials: The Contribution of MicroRNAs to the Inflammatory and Neoplastic Characteristics of Erdheim-Chester Disease. **Cancers**, v. 12, 2020.

WILMINK, J. M. et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: Macroscopic aspects. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 1, p. 53–60, 1999.

WILMINK, J. M. et al. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 270–273, 2002.

WITTE, M. B.; BARBUL, B. General principles of wound healing. **The Surgical clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

WU, F. et al. NEAT1/hsa-mir-98-5p/MAPK6 axis is involved in non-small-cell lung cancer development. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2836–2846, 1 mar. 2019.

WU, J. C. et al. Full-Thickness Thermal Injury Delays Wound Closure in a Murine Model. <https://home.liebertpub.com/wound>, v. 4, n. 2, p. 83–91, 15 fev. 2015.

YAMAZUMI, Y. et al. The RNA Binding Protein Mex-3B Is Required for IL-33 Induction in the Development of Allergic Airway Inflammation. **Cell Reports**, v. 16, n. 9, p. 2456–2471, 30 ago. 2016.

YI, H. et al. The miR-487b-3p/GRM3/TGF β signaling axis is an important regulator of colon cancer tumorigenesis. **Oncogene** **2017** **36:24**, v. 36, n. 24, p. 3477–3489, 23 jan. 2017.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. **StatPearls**, 22 dez. 2018.

ZHANG, D. L. et al. Effect of Wnt signaling pathway on wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 378, n. 2, p. 149–151, 9 jan. 2009.

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 copaíba**", 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