

YAGO GABRIEL DA SILVA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA PESQUISA  
DERMATOLÓGICA VETERINÁRIA: UM ESTUDO MORFOQUANTITATIVO E  
ULTRAESTRUTURAL DA PELE DE CUTIAS (*Dasyprocta prymnolopha*).**

TERESINA-PI  
2019

YAGO GABRIEL DA SILVA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA PESQUISA  
DERMATOLÓGICA VETERINÁRIA: UM ESTUDO MORFOQUANTITATIVO E  
ULTRAESTRUTURAL DA PELE DE CUTIAS (*Dasyprocta prymnolopha*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí  
como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.  
Área de concentração: Sanidade e reprodução animal  
Orientador: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

TERESINA-PI  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

- B238c    Barbosa, Yago Gabriel da Silva.  
          Caracterização de um modelo experimental para  
          pesquisa dermatológica veterinária: um estudo  
          morfoquantitativo e ultraestrutural da pele de cutias  
          (*Dasyprocta prymnolopha*). / Yago Gabriel da Silva  
          Barbosa.- 2019.  
          67 f.: il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
          Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal,  
          Teresina, 2019.  
          “Orientação: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto”.
1. Cutia-Dermatologia. 2. AFM. 3. Estereologia.  
I. Título.

CDD: 599.359

ANÁLISE ESTEREOLÓGICA E ULTRAMICROSCÓPICA DA PELE  
SAUDÁVEL DE CUTIAS (*DASYPROCTA PRIMNOLOPHA*) ADULTAS  
CRIADAS EM CATIVEIRO

YAGO GABRIEL DA SILVA BARBOSA

Dissertação aprovada em: 29/03/2019

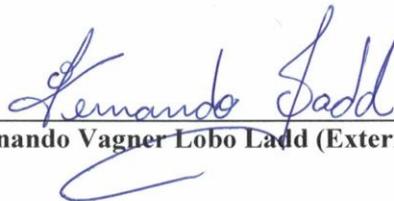
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Interna) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd (Externo) / UFRN



Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (Externa) / UFMA

*A vocês, Antônia, Pâmela, Diego, Yullane,  
Milton, pelo apoio em todas as  
circunstâncias e por tornarem essa  
jornada possível.*

## *Agradecimentos*

A Deus por permitir que eu concluísse mais essa etapa;

A minha mãe Antônia Maria da Conceição e Silva e meu pai Raimundo Jose Barbosa que embora não mais presente é parte do incentivo e motivação para continuar.

Ao meu PAIDRINHO Milton Pereira que acreditou, me apoiou e é uma das principais razões desse sonho se realizar e toda minha família que é impossível listar o nome de todos.

Aos meus amados irmãos Diego e Yullane Barbosa, Rodrigo Ferreira, Guilherme Sousa, que me ensinaram a acreditar e lutar sempre pelos meus sonhos, lutando contra as dificuldades que aparecem em nossas vidas e minha amada Pamela Karoliny pela paciência e compreensão nos vários momentos de ausência em sua vida, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pela motivação.

A todos os professores que fizeram parte da minha vida até os dias atuais em especial a Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciana Magalhaes Rebelo Alencar, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Acelina Martins de Carvalho e meu orientador Dr. Napoleão Martins Argolo Neto pela oportunidade, disponibilidade e ensinamentos pelos quais sou grato.

A todas as novas amigas conquistadas no NUPcelt, Fabiana, Leiliane, M.V Herminio, Janete, M.V Cleiton, Luciana, Flavia, dr<sup>a</sup> Lucilene, Marina, Wanderson, todos pós-graduandos que fizeram parte dessa jornada. Por fim, um obrigado muito especial às minhas tias da copa por terem aguentado os abusos por café durante dois anos.

*“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível, e de repente  
você estará fazendo o impossível.”*

*(São Francisco de Assis)*

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>MANUSCRITO I.....</b>	<b>15</b>
INTRODUÇÃO .....	17
DESENVOLVIMENTO .....	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	23
REFERÊNCIAS.....	24
<b>MANUSCRITO II.....</b>	<b>28</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>29</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>30</b>
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Análise estereológica.....	33
Avaliação por microscopia de força atômica.....	35
Delineamento estatístico.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO .....	56
AGRADECIMENTOS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA DE BIOPSIA CUTÂNEA DE CUTIAS (*DASYPROCTA PRIMNOLOPHA*), COM SOBREPOSIÇÃO DO SISTEMA—TESTE PARA CONTAGEM DE PONTOS INCIDENTES NAS DÉRMICAS (29 PONTOS) E EPIDÉRMICAS (4 PONTOS), CONTADOS PARA ESTIMAR A VARIÁVEL ‘VOLUME REFERÊNCIA’ DE CADA CAMADA 35
- FIGURA 2:** DISCRIÇÃO DO APARELHO DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA UTILIZADO 36
- FIGURA 3:** FOTOMICROGRAFIA DA PELE SAUDÁVEL DE CUTIAS MACHO, ADULTAS. COLORAÇÃO EM H&E. A: AMOSTRA DE PELE DE COXIM, EVIDENCIANDO OS ESTRATOS CÓRNEO (C), GRANULOSO (G), ESPINHOSO (E), BASAL (B), JUNÇÃO DERMO EPIDÉRMICA (SETA) E CAPILAR (CIRCULO). B: AMOSTRA DE PELE DORSAL, EVIDENCIANDO FOLÍCULO PILOSO (FP), GLÂNDULA SEBÁCEA (GSE) E GLÂNDULA SUDORÍPARA (GSU). 38
- FIGURA 4:** FOTOMICROGRAFIA DA PELE SAUDÁVEL DE CUTIAS MACHO, ADULTAS. COLORAÇÃO DE H&E. A: AMOSTRA DE PELE DE COXIM, DEMONSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA GLÂNDULA SEBÁCEA (SETA) PROFUNDAMENTE NA DERME RETICULAR. B: AMOSTRA DE PELE DORSAL, EVIDENCIANDO ASPECTO ALVEOLAR RAMIFICADO, EM MAIOR AUMENTO, DA GLÂNDULA SEBÁCEA (SETA). AUMENTO DE 30X E 40 X RESPECTIVAMENTE, AVALIADO SOB LUZ BRANCA. 40
- FIGURA 5:** FOTOMICROGRAFIA DA PELE SAUDÁVEL DE CUTIA MACHO, ADULTA. COLORAÇÃO DE H&E: CAMADA GRANULAR E GRÂNULOS (RETÂNGULO), CÉLULA DE LANGHERANS (CIRCULO) E MELANÓCITO (SETA) EM AUMENTO DE 100X EM MICROSCOPIA ÓTICA. 42
- FIGURA 6:** ULTRA FOTOMICROGRAFIA DE VARREDURA TRIDIMENSIONAL DE AMOSTRAS DE PELE SAUDÁVEL DE CUTIAS, DEMONSTRANDO A ORGANIZAÇÃO DO TECIDO E AMPLITUDE TOPOGRÁFICA ENTRE NANÔMETROS E MICRÔMETROS. EM ÂNGULOS TRANSVERSAIS DE VARREDURA DE SONDA, IDENTIFICA-SE A: ESTRATO CUTÂNEO DE PELE ESPESSA, B: ESTRATO CÓRNEO, C: ESTRATO GRANULOSO, D: ESTRATO ESPINHOSO, E:

ESTRATO BASAL OU GERMINATIVO. EM ÂNGULO LONGITUDINAL DE VARREDURA DE SONDA, IDENTIFICA-SE

F: EPIDERME E DERME DE PELE FINA EM REGIÃO DORSAL. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. 44

**FIGURA 7:** FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA DE BIOPSIA DE PELE ESPESSE DE CUTIA, EM REGIÃO DE ESTRATO CÓRNEO.

IMAGENS NANOMÉTRICAS DE CORNEODESMOSSOMOS (CIRCULO), ENTRE AS CAMADAS DO ESTRATO.

IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. 45

**FIGURA 8:** FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA DE BIOPSIA DE PELE FINA (A) E PELE ESPESSE (C) DE CUTIAS CORADO

PELA TÉCNICA DE HEMATOXILINA & EOSINA, IDENTIFICANDO SEUS ESTRATOS CUTÂNEOS (A) ESTRATO

CÓRNEO, (B) ESTRATO GRANULOSO (C) ESTRATO ESPINHOSO (D) ESTRATO BASAL OU GERMINATIVO (E)

DERME E SUAS RESPECTIVAS IMAGENS NANOMÉTRICAS TRIDIMENSIONAIS E AMPLITUDES TOPOGRÁFICAS

ENTRE NANÔMETROS E MICRÔMETROS, OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. 48

**FIGURA 9:** ULTRA FOTOMICROGRAFIA DE VARREDURA TRIDIMENSIONAL DE AMOSTRAS DE PELE SAUDÁVEL DE

CUTIAS, DEMONSTRANDO DERME E ANEXOS E SUAS RESPECTIVAS AMPLITUDES TOPOGRÁFICAS EM

NANÔMETROS E MICRÔMETROS. AI: ÂNGULO TRANSVERSAL DE SONDA EM DERME RETICULAR, AII:

ÂNGULO LONGITUDINAL DE SONDA DEMONSTRANDO ABUNDANTE SUBSTANCIA AMORFA EXTRACELULAR EM

DERME RETICULAR. BI: ÂNGULO TRANSVERSAL DE SONDA EM FRAGMENTO DE  $6\mu\text{M}$  DE UMA GLÂNDULA

SUDORÍPARA DENOTANDO ORGANIZAÇÃO LONGILÍNEA TUBULAR, BII: ÂNGULO LONGITUDINAL DE SONDA

DEMONSTRANDO ASPECTO TUBULAR RAMIFICADO DE GLÂNDULA SUDORÍPARA. CI: ÂNGULO TRANSVERSAL

DE SONDA EM GLÂNDULA SEBÁCEA. CII: ÂNGULO LONGITUDINAL DE SONDA EM GLÂNDULA SEBÁCEA. EM

AMBOS, IDENTIFICA-SE ORGANIZAÇÃO ALVEOLAR RAMIFICADA SEPARADA POR SEPTOS ELEVADOS E BEM

CIRCUNSCRITOS. IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. 51

**FIGURA 10:** AMOSTRAS DE 6MM DA PELE SAUDÁVEL DE CUTIAS (N=6) DE QUATRO ÁREAS CORPORAIS

DISTINTAS. VALORES MÉDIOS ESTEREOLÓGICOS DO VOLUME CAVALIERI EPIDÉRMICO ENTRE AS REGIÕES DE

PELE FINA (JOELHO, VENTRE E DORSO) E PELE ESPESSE (COXIM). DADOS SIGNIFICATIVOS A  $p < 0,05$ . 50

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> AMOSTRAS DE 6MM DA PELE SAUDÁVEL DE CUTIAS (N=6) MACHOS E FÊMEAS. VALORES MÉDIOS ESTEREOLÓGICOS DE VOLUME EPIDÉRMICO (V.EPI) E DÉRMICO (V.DER). .....	52
<b>TABELA 2:</b> VALORES MÉDIOS ESTEREOLÓGICOS PARA AS VARIÁVEIS VOLUME CAVALIERI EPIDÉRMICO , NA AVALIAÇÃO DE BIOPSIAS CUTÂNEAS EM CUTIAS, (N=6) , ENTRE AS DIFERENTES REGIÕES. ....	52
<b>TABELA 3:</b> VALORES MÉDIOS ESTEREOLÓGICOS PARA VOLUME TOTAL DE CADA ESTRATO EPIDÉRMICO, EM AMOSTRAS DE BIOPSIAS CUTÂNEAS DE CUTIAS, (N=6), ENTRE MACHOS E FÊMEAS . ....	54
<b>TABELA 4:</b> VALORES MÉDIOS ESTEREOLÓGICOS PARA O VOLUME TOTAL DE CADA ESTRATO EPIDÉRMICO, NA AVALIAÇÃO DE BIOPSIAS CUTÂNEAS DE CUTIAS (N=6) , ENTRE QUATRO REGIÕES DISTINTAS. ....	54

## RESUMO

**Introdução.** Os murinos constituem-se no principal modelo adotado para estudos em dermatologia humana e veterinária. Contudo, persistem relevantes limitações quanto a sua empregabilidade decorrente do reduzido tamanho de camundongos e ratos e a elevada taxa metabólica das espécies. Alternativamente a este modelo, a cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) é um roedor silvestre de porte médio encontrado em todo continente Americano, de elevada rusticidade, docilidade e prolificidade, cujo tamanho e características de manejo a candidatam a potencial modelo animal (*Dasyproctidae*) substituto ao tradicional murino. Contudo, ao contrário de outros roedores, na espécie cutia, pouco se conhece sobre os estratos epidérmicos e anexos cutâneos, perdurando significativas incertezas sobre a caracterização da pele nesses animais. O objetivo deste estudo é descrever e quantificar os estratos epidérmicos e anexos cutâneos de cutias machos e fêmeas, criadas em cativeiro, para fim de futura validação da espécie como modelo para estudos dermatológicos. **Materiais e métodos.** Foi adotado um delineamento casualizado, composto de seis cutias saudáveis, alocadas em dois grupos, nomeados conforme o sexo do animal, machos (GM) e fêmeas (GF). Foram obtidas amostras cutâneas para avaliação estereológica e ultraestrutural por microscopia de força atômica (AFM). Para as análises estereológicas, foram avaliadas quatro amostras de pele saudável, de cada animal, obtidas de quatro regiões anatômicas: dorsal tóraco-lombar, plantar do coxim do membro pélvico, ventral mesogástrica e lateral da articulação do joelho. Para análises de AFM, obtiveram-se duas amostras de pele, divididas em pele fina (dorso) e pele espessa (coxim). As amostras cutâneas foram processadas de modo convencional e cortadas a quatro micrometros e coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para análise estereológica e cortadas a dois micrometros em lamínulas de 13mm, sem coloração, para análise por AFM. Realizou-se análise variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Resultados e discussão.** Identificou-se que não há diferenças estatísticas da volumetria epidérmica e dérmica entre machos e fêmeas, o que sugere que os hormônios sexuais aparentemente não influenciam o volume dos estratos e camadas da pele. Diametralmente, identificou-se diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) entre as camadas da pele, possuindo a derme maior volume total que a epiderme. Analogamente, as amostras de pele fina apresentaram diferenças significativas das amostras de pele espessa, havendo diferenças entre todos os estratos epidérmicos, quando comparados entre si. Mas, os estratos não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes regiões anatômicas de pele fina avaliadas. Os resultados denotam que os estratos epidérmicos são bem delimitados e a volumetria correlaciona-se provavelmente ao tamanho e densidade celular dos ceratinócitos. A AFM permitiu identificar que a pele de cutias não apresenta topografia pavimentosa linear e uniforme, mas sim amplitude topográfica que eleva-se a partir da membrana basal, com organização não homogênea a partir do estrato granuloso, denotando sobreposição celular. Identificou-se corneodesmossomos e tonofilamentos em todos os estratos epidérmicos, inclusive estrato córneo, sugerindo provável manutenção da atividade das proteínas de ancoragem, mesmo após cornificação destas células. **Conclusão.** A pele de cutias não apresenta diferenças quanto ao sexo. Ademais, apresenta estratos e camadas bem delimitados, cujos volumes são similares entre as amostras de pele fina em diferentes regiões anatômicas. Os resultados sugerem que a cutia é um modelo potencial para estudos dermatológicos por apresentar homogeneidade do tecido cutâneo entre as regiões corpóreas e cuja estratificação epitelial apresenta volume e morfologia distintos entre si, o que poderá favorecer a aplicação futura de métodos sistemáticos de investigação.

**Palavras-chave:** Cutia, AFM, estereologia, dermatologia.

## ABSTRACT

**Introduction.** Murines are the main model adopted for studies in human and veterinary dermatology. However, there remain relevant limitations as to their employability due to the small size of mice and rats and the high metabolic rate of the species. Alternatively to this model, the cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) is a medium-sized wild rodent found throughout the Americas, with a high rusticity, docility and prolificacy, whose size and management characteristics are a potential substitute for the traditional animal model (*Dasyproctidae*) murine. However, unlike other rodents, in the *Cutia* species, little is known about the epidermal strata and cutaneous appendages, and significant uncertainties remain regarding the characterization of the skin in these animals. The objective of this study is to describe and quantify the epidermal layers and cutaneous attachments of male and female agouti, kept in captivity, for future validation of the species as a model for dermatological studies. **Materials and methods.** It was adopted a randomized design, composed of six healthy fruits, allocated in two groups, named according to the sex of the animal, males (GM) and females (GF). Cutaneous samples were obtained for stereological and ultrastructural evaluation by atomic force microscopy (AFM). For the stereological analyzes, four healthy skin samples from each animal were obtained from four anatomical regions: thoracolumbar dorsal, pelvic limb cushion, mesogastric ventral and lateral knee joint. For AFM analysis, two skin samples were obtained, divided into thin skin (back) and thick skin (cushion). Cutaneous samples were conventionally processed and cut to four microns and stained with hematoxylin and eosin (HE) for stereological analysis and cut to two micrometres in 13mm coverslips without staining for AFM analysis. An analysis was performed (ANOVA), followed by the Tukey test at 5% probability. **Results and discussion.** It has been identified that there are no statistical differences in epidermal and dermal volume between males and females, suggesting that sex hormones apparently do not influence the volume of strata and skin layers. Diametrically, significant differences ( $p < 0.05$ ) were identified between the skin layers, with the dermis having a larger total volume than the epidermis. Similarly, thin skin samples showed significant differences in thick skin samples, with differences among all epidermal layers when compared to each other. However, the strata did not present significant differences between the different anatomical regions of thin skin evaluated. The results indicate that the epidermal layers are well delimited and the volumetry probably correlates with the size and cellular density of keratinocytes. The AFM allowed to identify that the skin of agoutis does not present a linear and uniform topographic pavement, but rather topographic amplitude that rises from the basal membrane, with non-homogeneous organization from the granular stratum, denoting cellular overlap. Corneodesmosomes and tonofilaments were identified in all the epidermal strata, including stratum corneum, suggesting probable maintenance of the anchorage proteins activity, even after cornification of these cells. **Conclusion.** The skin of agoutis does not present differences as to the sex. In addition, it presents well-delimited strata and layers, whose volumes are similar between fine-skin samples in different anatomical regions. The results suggest that cutia is a potential model for dermatological studies because it presents homogeneity of the cutaneous tissue between the corporeal regions and the epithelial layering presents distinct volume and morphology among them, which may favor the future application of systematic methods of investigation.

**Keywords:** Agouti, AFM, stereology, dermatology

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos morfológicos constituem etapa fundamental da pesquisa dermatológica em humanos e animais, por disponibilizar subsídios científicos referenciais para fins de comparação e padronização de normalidade intraespecíficos (KAMP et al., 2009). De uma forma geral, os estratos cutâneos tem sido objeto de muitos estudos morfológicos e ultraestruturais, principalmente devido à sua função de barreira física para sistema imunológico e mecanismos envolvidos na administração de agentes tópicos externos para as camadas mais internas. Consequentemente, sabe-se que os estratos dérmicos e epidérmicos, bem como os anexos cutâneos saudáveis variam entre as espécies em quantidade, dimensões e morfologia (KAMP et al., 2011).

Os murinos constituem-se no principal modelo adotado para estudos em dermatologia humana e veterinária. Contudo, persistem relevantes limitações quanto a sua empregabilidade decorrente do reduzido tamanho de camundongos e ratos e a elevada taxa metabólica das espécies.

Alternativamente a este modelo, a cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) é um roedor silvestre de porte médio encontrado em todo continente americano, de elevada rusticidade, docilidade e prolificidade, cujo tamanho e características de manejo a candidatam a potencial modelo animal (*Dasyproctidae*) substituto ao tradicional murinho. Porém deve-se estabelecer valores de referência e dimensões ultraestruturais da pele saudável destes possíveis substitutos, o que não é tão simples como possa parecer. As técnicas morfológicas convencionais baseadas na identificação microscópica de amostras de tecido, apresentam distorções das dimensões teciduais. Tais distorções são consequências inerentes à histotécnica, e ao aspecto irregular da junção dermo-epidérmica, com elevado risco de imprecisão para estabelecer dimensões por estrato (AMENÁBAR et al., 2003; KAMP et al., 2009).

A resolução e profundidade das imagens, obtidas por meio de técnicas morfológicas convencionais, são limitadas ao plano bidimensional gerando dados qualitativos que se baseia na subjetividade do observador, induzindo maior imprecisão, além de não oferecer dados de topografia tecidual (AMENÁBAR et al., 2003).

A necessidade de produzir dados quantitativos, imaginológicos e topográficos confiáveis sobre componentes dos tecidos estimulou o desenvolvimento e o uso de métodos estereológicos e de microscopia de força atômica nas ciências biológicas (ANDERSEN et al., 2003). Dessa forma, parâmetros de perfis das estruturas observáveis em cortes de tecidos, podem extrapolar informações sobre estruturas no espaço tridimensional (BEDOYA et al., 2016).

Nesse contexto a microscopia de força atômica apresenta-se como uma técnica em potencial utilizada para caracterização morfológica para tecidos biológicos, já que a técnica permite imagens topográficas tridimensionais de materiais não condutores. Além disso, é possível elencar inúmeros benefícios que viabilizam e qualificam a técnica na avaliação de amostras biológica, a exemplo disso tem-se o custo benefício em relação a técnicas mais consagradas por não precisar de vácuo durante a varredura e muito menos soluções fixadoras ou materiais metalizadores; além de redução dos custos a técnica oferece qualidade de imagem, e características mecânicas e topográficas da amostra (PAIGE 2001; VENTURONI 2003). Como na espécie cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), pouco se conhece sobre estratos epidérmicos e anexos cutâneos, perdurando significativas incertezas sobre a caracterização da pele saudável e importante que para caracterização morfológica dessas seja utilizada tal ferramenta de análise.

O objetivo deste estudo é descrever e quantificar os estratos epidérmicos e anexos cutâneos de cutias (*Dasyprocta Priminolopha*) machos e fêmeas, criadas em cativeiro, para fim de futura validação da espécie como modelo para estudos dermatológicos.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: Introdução, Manuscrito I representado por um artigo de revisão, Manuscrito II representado por um artigo experimental inédito, Considerações Finais e Anexos.

O manuscrito I foi intitulado “**Aplicabilidade da estereologia e microscopia de força atômica à pesquisa dermatológica veterinária (revisão de literatura)**” e será encaminhado para publicação no Jornal Interdisciplinar de Biociências. O manuscrito II foi intitulado “**Caracterização de um modelo experimental para pesquisa dermatológica veterinária: estudo morfoquantitativo e ultraestrutural da pele de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)**” e será encaminhado para publicação no periódico PLOS ONE.

MANUSCRITO I

**APLICABILIDADE DA ESTEREOLOGIA E MICROSCOPIA DE FORÇA  
ATÔMICA À PESQUISA DERMATOLÓGICA VETERINÁRIA (REVISÃO DE  
LITERATURA)**

Apresentado sob as normas do Jornal Interdisciplinar de Biociências

ISSN: **2448-0002**

Zootecnia e Recursos pesqueiros – PPGCA/UFPI  
Sanidade e reprodução animal – área da dissertação

**APLICABILIDADE DA ESTEREOLOGIA E MICROSCOPIA DE FORÇA  
ATÔMICA À PESQUISA DERMATOLÓGICA VETERINÁRIA  
(REVISÃO DE LITERATURA)**

**APPLICABILITY OF STEREOLOGY AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR  
VETERINARY DERMATOLOGICAL RESEARCH  
(LITERATURE REVIEW)**

**Yago Gabriel da Silva Barbosa, Napoleão Martins Argôlo Neto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí-UFPI  
E-mail: y.ago.gabriel@hotmail.com

<sup>2</sup>Orientador e docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí  
E-mail: argolo\_napoleao@ufpi.edu.br

Endereço para correspondência:

e-mail: *argolo\_napoleao@ufpi.edu.br*

**RESUMO**

Em dermatologia veterinária, persiste a tradição morfológica de obtenção de dados essencialmente qualitativos. A estereologia e a microscopia de força atômica são técnicas que combinam estatística e microscopia avançada para obter informações quantitativas tridimensionais, como volume total, volume ultraestrutural, densidade volumétrica, número total de estruturas, dentre outras, a partir de imagens bidimensionais. Essas técnicas são cada vez mais relevantes para determinar a heterogeneidade morfológica comumente encontrada em amostras teciduais. A utilização concomitante dessas técnicas favorece a obtenção de dados matemáticos e físicos, os quais são mais fidedignos e de maior acurácia que dados morfológicos qualitativos, baseados em descrições morfométricas bidimensionais. Este trabalho consiste de uma pesquisa de natureza descritiva, na modalidade de pesquisa bibliográfica a respeito do uso das técnicas de delineamento estereológico e microscopia de força atômica. Para tanto, foram selecionados artigos em inglês e português, de 2003 a 2019, a partir de bases de dados online (PUBMED, SCIELO). A estereologia e microscopias avançadas como a microscopia de força atômica são altamente relevantes pela sua capacidade de fornecimento de dados sofisticados e fidedigno, na área de interesse tornando úteis para a prática morfodescritivas veterinárias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estereologia, AFM, análise topográfica.

## ABSTRACT

In veterinary dermatology, the morphological tradition of obtaining essentially qualitative data persists. Stereology and atomic force microscopy are techniques that combine statistics and advanced microscopy to obtain three-dimensional quantitative information, such as total volume, ultrastructural volume, volumetric density, total number of structures, among others, from two-dimensional images. These techniques are increasingly relevant to determine the morphological heterogeneity commonly found in tissue samples. The concomitant use of these techniques favors the obtaining of mathematical and physical data, which are more reliable and more accurate than qualitative morphological data, based on two-dimensional morphometric descriptions. This work consists of a research of a descriptive nature, in the method of bibliographical research regarding the use of the techniques of stereological delineation and atomic force microscopy. To do so, articles were selected in English and Portuguese, from 2003 to 2019, from online databases (PUBMED, SCIELO). Stereology and advanced microscopies such as atomic force microscopy are highly relevant for their ability to provide sophisticated and trustworthy data in the area of interest making veterinary morpho-descriptive practice useful.

**KEY WORDS:** Stereology, AFM, topographic analysis.

## INTRODUÇÃO

Avaliações morfológicas constituem etapa fundamental de quaisquer pesquisas dermatológicas veterinárias, por permitirem a descrição estrutural dos elementos que compõem a pele, favorecendo a padronização de características de normalidade intraespecíficas (KAMP et al., 2009). De uma forma geral, as camadas e estratos da pele têm sido objeto de muitos estudos morfológicos e ultraestruturais, tanto pela variabilidade entre as espécies, quanto à função imunológica, farmacodinâmica e farmacocinética cutânea (HUSSAIN, 2019; CHANG, 2017; AGARWAL, 2019; LOGGER,2019). Em medicina veterinária, dado o elevado número de espécies estudadas, tais características tornam-se ainda mais relevantes, haja visto que as variações de celularidade, densidade celular, volume celular e tecidual, influenciam a fisiologia cutânea e, conseqüentemente, a rotina clínica para a espécie (KAMP et al., 2011).

O estabelecimento de valores de referência para as dimensões e ultraestrutura da pele saudável não é tão simples como possa parecer. As técnicas morfológicas convencionais bidimensionais *ex vivo*, baseadas na identificação microscópica de amostras de tecido,

apresentam distorções das dimensões teciduais. Tais distorções são consequências inerentes à histotécnica, que induz retração tecidual após o processamento convencional. Além disso, a morfologia irregular da junção dermo-epidérmica eleva o risco de imprecisão para estabelecer dimensões por estrato (AMENÁBAR et al., 2003; KAMP et al., 2009; CHEN et al., 2019).

A necessidade de análises morfométricas com dados quantitativos, imaginológicos e topográficos confiáveis sobre componentes da pele estimulou a adoção dos métodos de delineamento estereológicos e de microscopia de força atômica para estudos dermatológicos em seres Humanos, mas seu uso permanece restrito em animais (ANDERSEN et al., 2003; SARAVANAN, 2017).

A estereologia é o conjunto de métodos que permite inferências tridimensionais (3D) a partir de imagens bidimensionais fundamentados em princípios de amostragem rigorosa e precisa (KRISTIANSEN e NYENGAARD, 2012). Dessa forma, parâmetros de perfis das estruturas observáveis em cortes de tecido, podem extrapolar informações sobre estruturas no espaço tridimensional (BEDOYA et al., 2016). O delineamento estereológico permite estimar diversos parâmetros morfoquantitativos cutâneos como número e volume celular epidérmico, volume de fibras dérmicas, área de superfície e densidade tecidual, dentre outros (LACERDA, 2003; RODRIGUES, 2018).

Complementarmente a microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica utilizada para caracterização morfológica tridimensional de inúmeros tecidos. Esta técnica permite a identificação de características de profundidade e volume celular, bem como segmentação de cores e análises mecanobiológicas celulares, como viscoelasticidade e turgor, favorecendo a obtenção de dados que não seriam possíveis pela microscopia eletrônica de varredura ou transmissão (VENTURONI, 2003).

## **DESENVOLVIMENTO**

Esse trabalho é uma pesquisa de natureza descritiva e retrospectiva, na modalidade de pesquisa bibliográfica a respeito do uso de técnicas de análise morfológica e ultraestrutural da pele. Para tanto, fez-se levantamento bibliográfico de artigos científicos presentes em dois dos principais bancos de dados *online*, PubMed e Scientific Electronic Library Online (SCIELO), abrangendo o período compreendido entre 2003 e 2019.

Foram pesquisados e analisados artigos nacionais e internacionais contendo os descritores pele (*skin*), estudo estereológico (*stereologic study*) e microscopia de força atômica da pele (*skin atomic force microscopy*).

Para a pesquisa realizou-se associação dos descritores *skin* e *stereologic* no banco de dados PubMed. Foram encontrados 63 estudos relacionados a estereologia em pele, 30 em humanos, 27 em animais e 6 revisões de literatura. Apenas 38 nos últimos dez anos e a maior parte relacionada a cicatrização cutânea (Gráfico 1 em anexo). A mesma chave de busca foi utilizada no banco SCIELO, não sendo verificado nenhum estudo relacionado. Porém com a desassociação dos descritores verificou-se que, a utilização dos delineamentos estereológico tem sido objeto de estudo morfométrico em outros sistemas: renal 161publicações, endócrino 197 publicações, reprodutor 43 publicações e nervoso 136 publicações.

A utilização dos descritores para microscopia de força atômica em pele na base de dados PubMed identificou 230 publicações, sendo 109 em humanos, 78 em animais e 11 revisões bibliográficas. Destes, 181 foram publicados nos últimos dez anos. A busca na base de dados SCIELO não revelou nenhuma publicação na temática (Gráfico 1 em anexo).

Não foram identificadas publicações na temática que estabelecessem valores de referência ou padrões de caracterização para as camadas e estratos cutâneos em humanos ou animais. Desta forma, não é possível estabelecer valores referencias de volumetria por estereologia e características ultraestruturais por microscopia de força atômica da pele. Os trabalhos disponíveis mensuram o volume e descrevem a ultraestrutura dos elementos cutâneos sem estabelecer comparações com os valores de referência (MINOTA et al., 2019). Nestes, infere-se a evolução do fenômeno biológico estudado baseado na contribuição potencialmente positiva da estrutura analisada na fisiologia cutânea. Nos artigos que utilizaram modelos para cicatrização cutânea, por exemplo, a volumetria e caracterização ultraestrutural dos diferentes tipos de colágeno são comparados diretamente aos percentuais destas estruturas previamente definidas em modelos bidimensionais (KARLSSON et al., 2013). Tal fato é preocupante, pois dados tridimensionais ( $\text{mm}^3$ ) e bidimensionais ( $\text{mm}^2$ ) apresentam grandezas diferentes e, portanto, não são passíveis de comparação direta.

Neste contexto, mudanças histológicas e estruturais sutis podem desencadear efeitos potencialmente adversos, irreversíveis ou não-monitoráveis. Assim, são necessários métodos quantitativos sensíveis e precisos (MINOTA et al., 2019). Historicamente, métodos qualitativos geralmente referidos como métodos bidimensionais (2-D) têm sido mais frequentemente empregados (NOJIMA et al., 2017, CHEN et al., 2019, BROWN, 2017, AMINI, 2018). Porém, métodos bidimensionais não permitem inferências baseadas em valores quantitativos mensuráveis, o que limita a compreensão real das dimensões da pele, comprometem sensibilidade do método e a precisão estatística, elevando o risco de erros

(NOJIMA et al.,2017, CHEN et al.,2019, BROWN, 2017, AMINI, 2018 MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2016).

As limitações dos métodos 2-D podem ser evitadas através do uso de métodos acurados de obtenção de dados quantitativos, como estereologia. Esta, é uma técnica de medição e quantificação estrutural anatômica de estrema relevância em dermatologia (AZULAY et al., 2010, BROWN, 2017). O delineamento estereológico oferece abordagens práticas e cientificamente válidas para obter estimativas quantitativas precisas de mudanças estruturais histológicas (KAMP et al., 2009, NOJIMA et al.,2017, CHEN et al., 2019)

Os estudos utilizando o delineamento estereológico concentram-se particularmente nas áreas de desenvolvimento embrionário (ZHANG, 2018), evolução (BOGGILD, 2018), patologia (ASHKANI-ESFAHANI et al.,2019) e neurociências (YURT,2018). Em dermatologia veterinária, é escassa sua empregabilidade, apesar do potencial para utilização (KAMP et al, 2009 MARTINS et al, 2010, KAMP et al, 2011).

Para a dermatologia veterinária, a estereologia pode oferecer uma série de benefícios para análises em microscopia, favorecendo a obtenção de dados quantitativos precisos, permitindo inferências funcionais, a partir de imagens bidimensionais (GOKHALE et al.,2004). Como o delineamento estereológico permite estimar dados geométricos como volume, área, comprimento ou número de partículas (células ou outras estruturas), é possível descrever com precisão a morfologia tridimensional da pele (MARCOS et al., 2012, SARAVANAN et al., 2017).

A análise estereológica pode ser simplificada em duas etapas principais: a determinação da amostragem estatística apropriada para obtenção de amostras de tecido e secções histológicas, e a quantificação das estruturas de interesse (OAKLANDER, 2003, HERN, 2005). Para esta última, adota-se formas geométricas apropriadas, como pontos ou linhas, por exemplo, para sobreposição à secção histológica e subsequente, quantificação de pontos de interesse (Imagem 1 ) (KAMP et al, 2009).

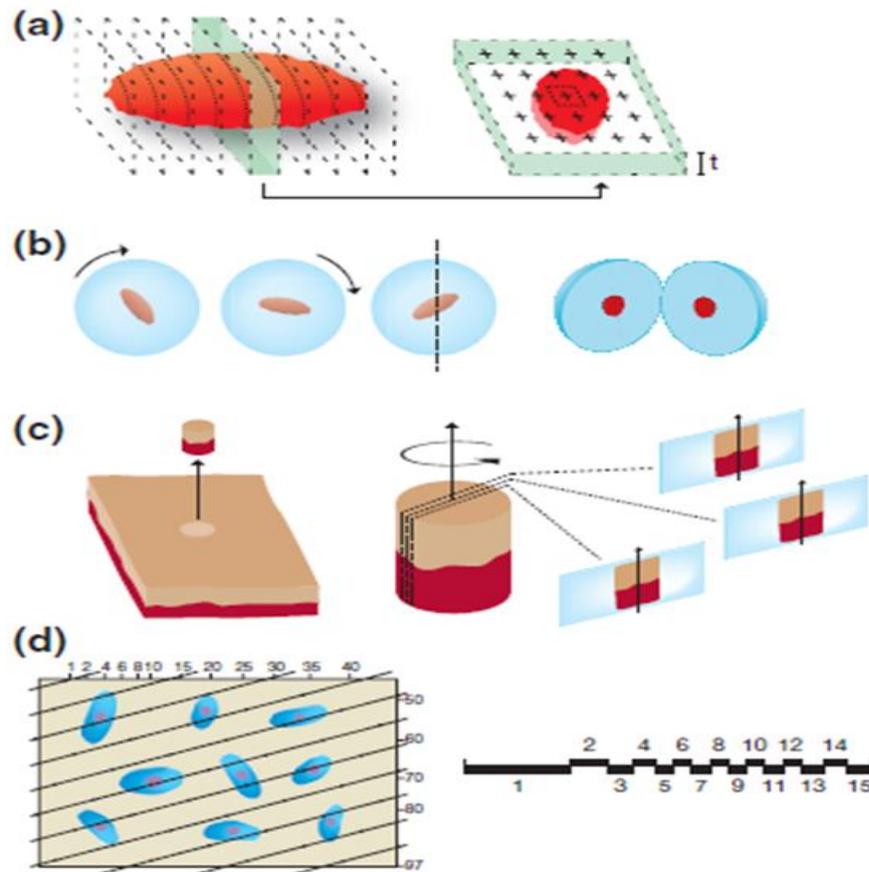


Imagem 1: (a) Uma ilustração do princípio de Cavalieri empregado para estimar o volume total da estrutura (b) Um pedaço de tecido embebido em uma bola de parafina rolando ao longo de uma mesa (SURS). c) Geração de seções e isotropização da pele. d) Ilustração esquemática de um campo de visão no microscópio ao estimar densidade de núcleos celulares. (Fonte Imagem: Adaptado de KAMP,2009).

As estimativas quantificadas obtidas possuirão, portanto, uma relação estatística com os valores reais no espaço tridimensional e, conseqüentemente, a variação de erros das estimativas pode ser prevista (KRISTIANSEN e NYENGAARD, 2012, SARAVANAN et al., 2017).

Avanços em sistemas de bioinformática também contribuíram para elevar a acurácia e precisão de delineamentos estereológicos, gerando o desenvolvimento de novos métodos de análise de imagem e padronização de seções teciduais (AMENÁBAR et al., 2006, JONES, 2013, SARAVANAN et al., 2017, LIU, 2017). Os pixels obtidos das imagens digitalizadas são utilizados para análises estereológica, desde que os mesmos possuam relação com cores e estruturas (JONES, 2013). Métodos de informática semi-automatizados de segmentação de cores, por exemplo, permitem a obtenção de dados estereológicos baseados nos diferentes espectros de pixels (AMENÁBAR et al., 2006, JONES, 2013 SARAVANAN et al., 2017 e RODRIGUES, 2018).

Complementarmente à estereologia, a AFM possui relevante potencial de empregabilidade na dermatologia veterinária, por permitir a obtenção de imagens topográficas com resolução atômica, por meio do modos de varredura (TANG, 2010, ALCARAZ et al.,2018). Além deste, pode caracterizar as propriedades biomecânicas da epiderme e derme, como rigidez, por exemplo, por meio do módulo de Young (FERREIRA,2006, PAYDAR,2016,). Neste, as imagens atômicas são obtidas pela técnica de contato intermitente, no qual a sonda de AFM, com dimensões nanométricas, presa à extremidade do *Cantilever*, de 125 $\mu\text{m}$ , toca a superfície celular, determinando suas características biomecânicas (Imagem 2) (PINTO, 2015; PEÑUELA et al., 2018, KWON,2019).

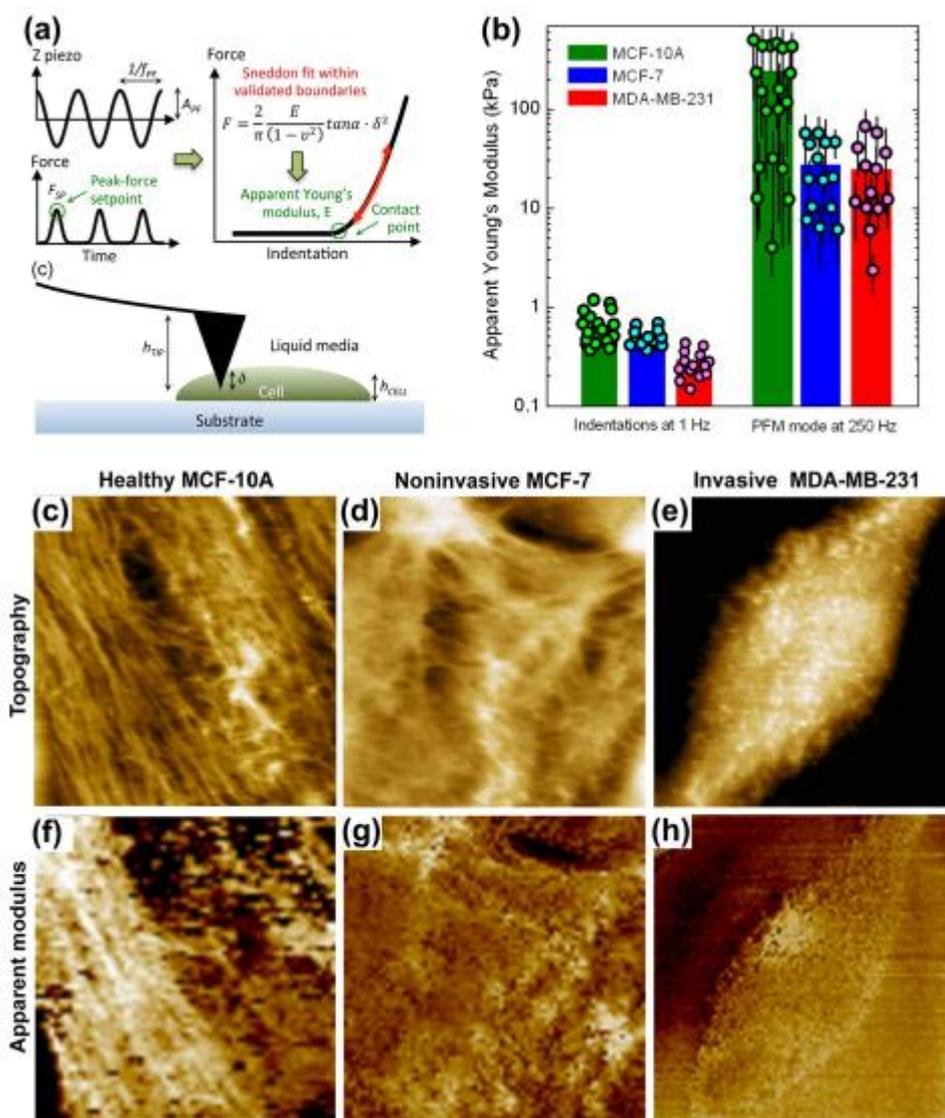


Figura 2: (a) Representação esquemática da operação da AFM para geração de imagens células vivas. b) Comparação dos valores médios do módulo de Young para células isoladas obtidas por contato. (c) - (e) imagens de topologia AFM de (c) célula saudável, (d) células MCF-7 não invasivas e (e) células MDA-MB-231

invasivas. (f) - (h) Imagens de mapeamento nanomecânico de (f) células MCF-10A saudáveis, (g) células MCF-7 não invasivas, e (h) células MDA-MB-231 invasivas. (Fonte Imagem: Adaptado de KWON,2019).

Contudo, a técnica deve ser adaptada ao tecido cutâneo, por meio da calibração precisa do microscópio de AFM, afim de evitar danos celulares induzidos pelas forças de adesão do tecido à sonda de AFM (BUTT,2005, ALCARAZ et al.,2018).

Neste contexto, a AFM destaca-se por ser a primeira técnica de microscopia avançada para dimensões nanométricas e subnanométrica, fornecendo mapas topográficos precisos de resolução atômica (FERREIRA,2006, BUTT,2005, ALCARAZ et al.,2018).

Contrariamente às outras técnicas de microscopia de alta resolução, que exigem protocolos de fixação apropriados, o AFM dispensa a preparação prévia das amostras, permitindo a avaliação das mesmas até em meio líquido (BUTT,2005). Apesar destes benefícios, ainda é escassa sua utilização em dermatologia veterinária, limitando-se a estudos cicatriciais em murinos (RAGHUWANSHI et al., 2017). Em dermatologia humana, recentemente descreveu-se a composição nanoestrutural da pele (ECKERSLEY et al., 2018), corneócitos (DANZBERGER et al., 2018) e fibras colágenas (QUIGLEY et al.,2018).

A rigidez da epiderme, a espessura, orientação e periodicidade das fibras de colágeno, presentes na derme papilar humana, bem como suas particularidades nanoestruturais, foram recentemente mensuradas (OLEJNIK, A.; NOWAK, I 2017, PEÑUELA et al., 2018 e CHANG et al.,2017). Estas descrições são importantes para determinação de parâmetros de normalidade, haja visto que entidades nosológicas distintas podem alterar as propriedades mecânicas da pele e seus componentes, as quais podem ser identificadas por AFM (VIELMUTH, 2018).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O delineamento estereológico e a microscopia de força atômica são técnicas avançadas que permitem a obtenção de dados teciduais volumétricos e ultraestruturais, com relevante perspectiva para utilização em estudos dermatológicos. Contudo, sua utilização é escassa em dermatologia veterinária, refletindo-se num volume insipiente de publicações nos últimos 16 anos. A literatura carece de valores de referência ou padrões de caracterização para as camadas e estratos cutâneos, tanto em humanos quanto em animais, denotando a necessidade de pesquisas na temática.

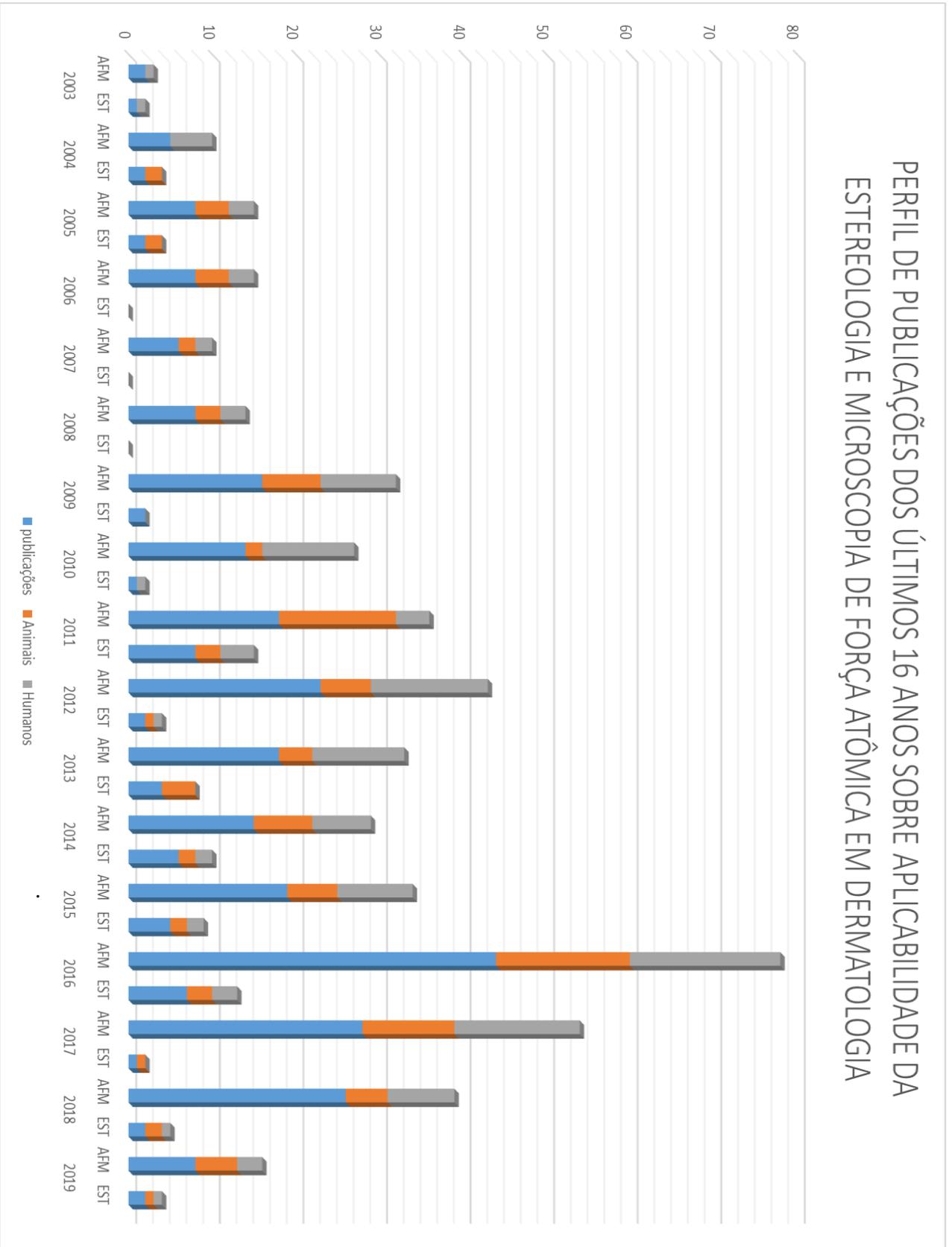
## REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, J et al. Bidirectional mechanobiology between cells and their local extracellular matrix probed by atomic force microscopy. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press. p. 71-81. 2018.
- AGARWAL, S.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, Skin. In: **StatPearls** [Internet]. StatPearls Publishing, 2019.
- AMENÁBAR, J. M.; HUGO, F.N.; FOSSATI, A. M. C.; PADILHA, D. M. P The use of stereology as a method in histological research. **Rev Fac Odontol**. v 44, p 62-65. 2003.
- AMENÁBAR, J. M., MARTINS G. B., CHERUBINI, K., FIGUEIREDO M. A. Z. Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. **Journal of Oral Science**. v. 48, n. 3, p. 139-143. 2006.
- AMINI, A et al. Stereological and molecular studies on the combined effects of photobiomodulation and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on wound healing in diabetic rats. **J Photochem Photobiol B**. v. 182 p 42-51 2018.
- ANDERSEN, B.B., PAKKENBERG, B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **Br J Psychiatry**. v. 182, p. 354-361. 2003.
- ASHKANI-ESFAHANI, S et al. The Healing Effect of Plantago Major and Aloe Vera Mixture in Excisional Full Thickness Skin Wounds: Stereological Study. **World journal of plastic surgery**, v. 8, n. 1, p. 51, 2019.
- AZULAY, M. M.; CUZZI, T.; PINHEIRO J. C. A.; AZULAY, D. R.; RANGEL, G. B. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia Cosmética. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 1, p.65-71. 2010.
- AZZI, L.; EL-ALFY M.; MARTEL C.; LABRIE, F. Gender Differences in Mouse Skin Morphology and Specific Effects of Sex Steroids and Dehydroepiandrosterone. **J Invest Dermatol**. v. 124, p. 22 –27. 2005.
- BEDOYA, S. A. O, et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq Bras Med Vet e Zootec**.2016;68:147-154.
- BOGGILD, S et al. Highly segregated localization of the functionally related vps10p receptors sortilin and SorCS2 during neurodevelopment. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 8, p. 1267-1286, 2018.
- BROWN, D L. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. **J. Toxic. Pathol.**;v 30.p. 183-191 2017.
- BUTT, H.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic forcemicroscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**. n. 59. 2005.
- CHANG, A.C.; LIU, B.H.; SHAO, P.L.; LIAO, J.D. Structure-dependet behaviours of skin layers studied by atomic force microscopy. **Journal of Microscopy**. v. 267. p. 265-271. 2017.
- CHEN, Y et al. Three-dimensional (3D) imaging of biomarkers in human core needle biopsies of normal and cancerous breast tissue. **Cancer Research**. V.9, p.5624. 2019
- DANZBERGER, J. et al. Glycan distribution and density in native skin's stratum corneum. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 3, p. 450-458, 2018.
- DICKSON, J.M.; WEAVERS, H. M.; MITCHELL, N.; WINTER E.M.; WILKINSON, I.D.; VANBEEK, E.J.; GRIFFITHS, P.D. Choice of cross size in stereology - a cautionary note. **Neuroradiology**. v. 45, p.896-899. 2003.
- DUFORT, C C.; PASZEK, M. J.; WEAVER, V M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 5, p. 308, 2011.
- ECKERSLEY, A et al. Structural and compositional diversity of fibrillin microfibrils in human tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5117-5133, 2018.

- FERREIRA, A. A. P; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, p. 137-142, 2006.
- GOKHALE, A. M. et al. Design- based estimation of surface area in thick tissue sections of arbitrary orientation using virtual cycloids. **Journal of microscopy**, v. 216, n. 1, p. 25-31, 2004.
- HERN, S. et al. In vivo quantification of the structural abnormalities in psoriatic microvessels before and after pulsed dye laser treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 3, p. 505-511, 2005.
- HUSSAIN, H et al. Quantitative Analysis of Free Amino Acids and Urea Derived from Isolated Corneocytes of Healthy Young, Healthy Aged, and Diseased Skin. **Skin pharmacology and physiology**.2019;32:94-100.
- ISOLA , J.G.M.P.; MORAES, P. C.; RAHAL S. C.; MACHADO, M.R.F. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca (Cuniculus paca Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Pesq. Vet. Bras.** v. 33 p. 674-682. 2013.
- JONES, N. W. et al. Fractional volume of placental vessels in women with diabetes using a novel stereological 3D power Doppler technique. *Placenta*, v. 34, n. 11, p. 1002-1008, 2013.
- KAMP, S.; JEMEC, G. B. E.; KEMP, K.; KJELDSSEN C. R.; STENDERUP, K.; PAKKENBERG, B.; DAM T. N. Application of stereology to dermatological research. **Experimental Dermatology**. v. 18 p. 1001–1009. 2009.
- KAMP, S. et al. Stereological Estimation of Epidermal Volumes and Dermo-Epidermal Surface Area in Normal Skin. **Dermatology**, v. 223, n. 2, p.131-139, 2011.
- KARLSSON, P et al. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 18, n. 1, p. 48-53, 2013.
- KRISTIANSEN, S. L. B.; NYENGAARD, J. R. Digital stereology in neuropathology. **APMIS**. v.120, p.327–40. 2012.
- KWON, T; GUNASEKARAN, S; EOM, K. Atomic force microscopy-based cancer diagnosis by detecting cancer-specific biomolecules and cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 2019.
- LACERDA, M. C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cien**. v. 75, p. 469-86. 2003.
- LADD, F. V. Lobo et al. Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in superior cervical ganglia. In: International review of cell and molecular biology. **Academic Press**, p. 123-155. 2014.
- LIU, A.P.; CHAUDHURI, O.; PAREKH, S. H. New advances in probing cell–extracellular matrix interactions. **Integrative Biology**, v. 9, n. 5, p. 383-405. 2017.
- LOGGER, J.G.M et al. Anatomical site variation of water content in human skin measured by the Epsilon: A pilot study. **Skin Research and Technology**, 2019.
- MARCOS, R; MONTEIRO, R. A.F; ROCHA, E. The use of design-based stereology o evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **J. Anat.** v. 220, p 303–317. 2012.
- MARTINS, C et al. Quantification of mast cells and blood vessels in the skin of patients with cutaneous mucinosis. **Am J Dermatopathol**. v 32: p 453-8 2010.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E et al. Stereological Quantification of Cell-Cycle Kinetics and Mobilization of Epithelial Stem Cells during Wound Healing. **Methods Mol Biol**. V.1453: p. 93-107 2016.
- MINOTA, K et al. Refined Quantitation of Sweat Gland Innervation. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 2019.
- NOJIMA, S et al. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9269, 2017.

- OAKLANDER, Anne; STOCKS, Adelaine E.; MOUTON, Peter R. Number of Langerhans immune cells in painful and non-painful human skin after shingles. **Archives of dermatological research**, v. 294, n. 12, p. 529-535, 2003.
- OLEJNIK, A.; NOWAK, I. Application of atomic force microscopy in skin related research. **Microscopy and imaging scanning**. v.3. p. 27-33. 2017.
- PAYDAR, S et al. Structural Alteration in Dermal Vessels and Collagen Bundles following Exposure of Skin Wound to Zeolite–Bentonite Compound. *Journal of pharmaceuticals*, 2016;2016.
- PINTO, E. P; RAMOS, G. Q.; DA FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2015.
- PEÑUELA, L et al . Atomic force microscopy for biomechanical and structural analysis of human dermis: A complementary tool for medical diagnosis and therapy monitoring. **Wiley Experimental Dermatology**. v. 27. p. 150-155. 2018.
- QUIGLEY, A.S. et al. Combining tensile testing and structural analysis at the single collagen fibril level. **Scientific data**, v. 5, p. 180229, 2018.
- RAGHUWANSHI, N et al. Synergistic effects of Woodfordia fruticosa gold nanoparticles in preventing microbial adhesion and accelerating wound healing in Wistar albino rats in vivo. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 252-262, 2017.
- RODRIGUES, H.W.S et al. Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal Stem Cells. **Acta Sci. Veterinariae.**; 46:11-3536. 2018.
- SARAVANAN, C et al. Meeting report: Tissue-based image analysis. **Toxicologic pathology**, v. 45, n. 7, p. 983-1003, 2017.
- TANG, W, BHUSHAN, B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 76:1-15.
- VIELMUTH, F. et al. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Front Immunol.*; v. 28p. 9-485. 2018.
- VENTURONI, M.; GUTSMAN, T.; FANTNER, G.; KINDT, J.; HANSMA, P. investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy. **Biochemical and biophysical research communications**. v 303.p. 508-513 2003.
- YURT, K.K et al. A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods **in neuroscience**. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 93, p. 16-29, 2018.
- ZHANG, J et al. Morphologic and morphometric study on microvasculature of developing mouse kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 315, n. 4, p. F852-F860, 2018.

## Anexo I



MANUSCRITO II

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA PESQUISA  
DERMATOLÓGICA VETERINÁRIA: ESTUDO MORFOQUANTITATIVO E  
ULTRAESTRUTURAL DA PELE DE CUTIAS (*Dasyprocta prymnolopha*).**

Apresentado sob as normas do periódico PLOS ONE

ISSN: 1932-6203

Zootecnia e Recursos pesqueiros – PPGCA/UFPI  
Sanidade e Reprodução animal – área da dissertação



46 **ABSTRACT**

47 **Introduction.** The cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) is a medium-sized wild rodent found  
48 throughout the American continent, with a high rusticity, docility and prolificacy, whose size  
49 and management characteristics make it possible to substitute the traditional animal model  
50 (*Dasyproctidae*). However, there are no data on the epidermal layers and skin attachments of  
51 agoutis, and there remain significant uncertainties about the characterization of the skin in  
52 these animals. The objective of this study was to describe and quantify epidermal and dermis  
53 volumes of male and female calves, kept in captivity, in order to validate the species as a  
54 model for dermatological studies. **Material and methods.** It was adopted a randomized  
55 design, composed of six healthy fruits, allocated in two groups, according to sex. Cutaneous  
56 samples were obtained for stereological and ultrastructural evaluation by atomic force  
57 microscopy (AFM). For the stereological analyzes, four healthy skin samples from each  
58 animal were obtained from four anatomical regions. For AFM analysis, two skin samples  
59 were obtained, divided into thin and thick skin. Samples were processed in a conventional  
60 manner, cut to four microns and stained with hematoxylin and eosin (HE) for stereological  
61 analysis and cut to two micrometres in 13mm coverslips without staining for AFM analysis.  
62 An analysis was performed (ANOVA), followed by the Tukey test at 5% probability. **Results**  
63 **and discursion.** It was identified that there are no statistical differences in epidermal and  
64 dermal volumetry between males and females. Diametrically, significant differences were  
65 identified between the skin layers, with the dermis having a greater total volume than the  
66 epidermis. Thin skin samples showed differences in the thick skin samples and the epidermal  
67 layers when compared to each other. However, the strata did not present significant  
68 differences between the different anatomical regions of thin skin evaluated. The results  
69 indicate that the epidermal layers are well delimited and the volumetry probably correlates  
70 with the size and cellular density of keratinocytes. AFM allowed to identify that the skin of  
71 agoutis does not present linear and uniform topography, but rather topographic amplitude that  
72 rises from the basal membrane, with non-homogeneous organization from the granular  
73 stratum. Corneodesmosomes and tonofilaments were identified in all the epidermal strata,  
74 including stratum corneum, suggesting probable maintenance of the anchorage proteins  
75 activity, even after cornification of these cells. **Conclusion.** The skin of agoutis does not  
76 present differences as to the sex. In addition, it presents well-delimited strata and layers,  
77 whose volumes are similar between fine-skin samples in different anatomical regions. The  
78 results suggest that cutia is a potential model for dermatological studies because it presents  
79 homogeneity of the cutaneous tissue between the corporeal regions and the epithelial layering  
80 presents distinct volume and morphology among them, which may favor the future  
81 application of systematic methods of investigation.

82 ]

83 **Keywords:** Morphoquantification, AFM, stereology, dermatology

84

85

86

87

88

## 89 INTRODUÇÃO

90 Espécies de roedores do gênero *Dasyprocta* têm sido utilizadas com modelo animal  
91 experimental em recentes pesquisas morfológicas e fisiológicas [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10] a  
92 exceção, até então, de pesquisas em dermatologia. Tem sido elencados aspectos físicos, como  
93 comprimento superior a 50cm e altura de até 40cm, bem como de manejo, como elevada  
94 rusticidade, docilidade e baixo custo de manutenção, além de fisiológicos como elevada  
95 prolificidade, como aspectos positivos para a utilização da espécie como modelo experimental  
96 [4,10,11]. Contudo, inexitem dados descritivos e morfoquantitativos cutâneos da espécie  
97 *Dasyprocta prymnolopha*, encontrada em todo continente americano e endêmica nas faixas de  
98 mata atlântica do Nordeste do Brasil [12].

99 Em outras espécies, técnicas de microscopia avançada, como microscopia de força  
100 atômica (AFM) e de morfometria tridimensional, como o delineamento estereológico, tem  
101 sido frequentemente utilizados para descrição, caracterização e quantificação celular e  
102 tecidual em diversos sistemas biológicos [13, 14,15].

103 A microscopia de força atômica (AFM) é uma ultramicroscopia tridimensional que  
104 produz grande quantidade de informações de alta resolução, permitindo a obtenção de dados  
105 de profundidade, volume e características mecânicas como viscoelasticidade celular, dentre  
106 outras [16]. Esta técnica permite a construção de mapas topográficos tridimensionais e  
107 mensuração de estruturas subnanométricas [17].

108 Em dermatologia humana, a AFM tem sido referenciada como de elevada  
109 sensibilidade [18,19], sendo utilizada para diagnóstico e monitoramento de alterações  
110 morfológicas associadas a entidades nosológicas distintas [20, 21], na avaliação do tratamento  
111 de feridas [22] e na análise biomecânica e estrutural da derme [23]. Contudo, na dermatologia  
112 são escassos os estudos utilizando a AFM [24,25] e inexitem estudos empregando esta  
113 técnica para o estudo da pele de cutias.

114 A estereologia é uma técnica morfométrica quantitativa, que permite a extração de  
115 informações microscópicas tridimensionais a partir de secções histológicas bidimensionais  
116 [26]. Esta técnica baseia-se na aplicação de princípios matemáticos e estatísticos, como  
117 amostragens aleatórias, uniformes e sistemáticas, por exemplo, sendo possível eliminar  
118 distorções comumente identificadas em estimativas morfométricas bidimensionais [27].  
119 Pesquisas contemporâneas têm reiterado a acurácia do método e relevância de sua  
120 aplicabilidade em estudos em dermatologia veterinária [28, 29, 30].

121 Algumas estruturas da pele normal de cadáveres humanos foram quantificadas [31,32],  
122 bem como foram descritas as patologias como mucinose cutânea e hidradenite supurativa  
123 [33, 34], bem como foi avaliado o processo cicatricial nas espécies em ratos [35, 36].  
124 Entretanto, até então, nenhum estudo estereológico foi realizado em cutias e ainda se  
125 desconhece a volumetria das camadas e estratos cutâneos nesta espécie.

126 A possibilidade de descrever e quantificar os estratos e camadas cutâneas da pele de  
127 cutias, numa abordagem tridimensional e ultraestrutural é uma ideia inovadora, em área de  
128 fronteira do conhecimento, que poderá contribuir indubitavelmente ao avanço da  
129 compreensão da morfologia e fisiologia desta espécie silvestre, que distribui-se em todo  
130 continente Americano, mas ainda tão pouco estudado.

131 O objetivo deste estudo foi descrever e quantificar os estratos epidérmicos e volume  
132 da derme de cutias machos e fêmeas, criadas em cativeiro, para fim de futura validação da  
133 espécie como modelo para estudos dermatológicos.

## 134 **MATERIAL E MÉTODOS**

135 As práticas de manipulação animal realizadas foram aprovadas pelo Comitê de Ética  
136 em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), de acordo com  
137 a declaração nº 407/17 e segundo as normas do Colegiado Brasileiro de Experiência Animal  
138 (COBEA).

139 Adotou-se um delineamento casualizado, composto dois grupos formados por três  
140 cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) saudáveis cada, de acordo com o sexo. Os animais foram  
141 nativos do bioma de cerrado do Nordeste do Brasil, capturados e criados em cativeiro segundo  
142 autorização SISBIO nº 60484-1 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos  
143 Naturais Renováveis (IBAMA). Os animais foram mantidos em criatório registrado junto ao  
144 IBAMA nº 02/08 - 618, em baias coletivas, alimentadas com ração comercial para roedores  
145 com 15% de proteína bruta, tubérculos e frutas regionais e água *ad libitum*.

146 Foram obtidas e avaliadas seis amostras de pele saudável de 6 mm de diâmetro, de  
147 cada animal. Destas, quatro amostras foram obtidas das regiões dorsal tóraco-lombar, plantar  
148 do coxim do membro pélvico, ventral mesogástrica e lateral da articulação do joelho e  
149 submetidas à delineamento estereológico. Duas amostras foram obtidas das regiões dorsal  
150 (pele fina) e coxim (pele espessa), sendo submetidas à avaliação por AFM.

#### 151 **Análise estereológica**

152  
153 As amostras de pele foram mensuradas diametralmente e pesadas antes e após  
154 desidratação, fixadas em paraformaldeído tamponado a 10% por 24h, e em seguida  
155 desidratadas em gradientes de concentração crescente de álcoois (70, 80, 90, 100%),  
156 diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica.

157 Para obtenção de dados quantitativos precisos e imparciais, os fragmentos foram  
158 pesados em balança de precisão, mensurados quanto ao comprimento e adotadas as  
159 amostragens sistemática e uniformemente aleatórias (SURS) [37]. Os blocos de parafina  
160 foram isotropizados afim de permitir que qualquer região da biopsia fosse amostrada e  
161 submetidos a cortes seriados de 4µm de espessura. O intervalo de secções foi diâmetro  
162 dependente, utilizando micrótomo rotativo, de forma perpendicular à superfície epidérmica e,  
163 portanto, paralelos ao eixo vertical.

164 Os cortes histológicos consecutivos foram distendidos em lâminas de vidro. De cada  
165 biopsia foram obtidas cinco lâminas respeitando-se o intervalo pré-determinado pelo  
166 diâmetros e tabela randomizada, totalizando 120 lâminas para análise. Em seguida, foram  
167 realizadas coloração de hematoxilina e eosina (HE) de forma convencional [38]. As amostras  
168 foram avaliadas sob microscopia de luz ótica e lupa em aumentos de 40x e 30x para  
169 fotomicrografias e identificação estrutural das biopsias, além da realização de  
170 morfoquantificação utilizando o princípio de Cavalieri, respectivamente. O volume das  
171 amostras ou volume Cavalieri foi estimado por meio da formula:  $V_{Ref} = T \times K \times \Sigma A$ , onde: T  
172 = espessura média das secções histológicas, K= distância entre as secções e A= área das  
173 secções histológicas [37]. O coeficiente de erro (CE) para a estimativa do volume Cavalieri  
174 (V) [37].

175 De cada lâmina de cada grupo experimental, foram obtidas três fotomicrografias em  
176 aumento de 40x. Desta forma obteve-se 380 imagens para determinação da densidade de  
177 volume estimada de acordo com a equação:  $V_{vc} = [\Sigma P(Est\ epi) / \Sigma P(V_t)]$ , onde  $\Sigma P(ep)$ =  
178 Número total de pontos de um sistema teste que tocam os estratos epidérmicos nas  
179 regiões de interesse e  $\Sigma P(VE)$ = Número total de pontos do mesmo sistema teste que toca  
180 toda a área de interesse.

181 As fotomicrografias foram avaliadas com auxílio do software Image J<sup>®</sup> e utilizou-se o  
182 plugin *Grid* para aplicação do sistema teste (ou malha de quadrantes) de pontos nas  
183 fotomicrografias digitais.

184 Obtidos os dados, o volume total ou Cavalieri foi estimado a partir do produto da  
185 distância entre as secções de intervalos sistemáticos e aleatórios de cada biopsia realizada e a  
186 soma das áreas do objeto obtida através do produto do número de pontos que toca a estrutura  
187 de interesse (Figura 1) pela área por pondo do Grid.

188

189

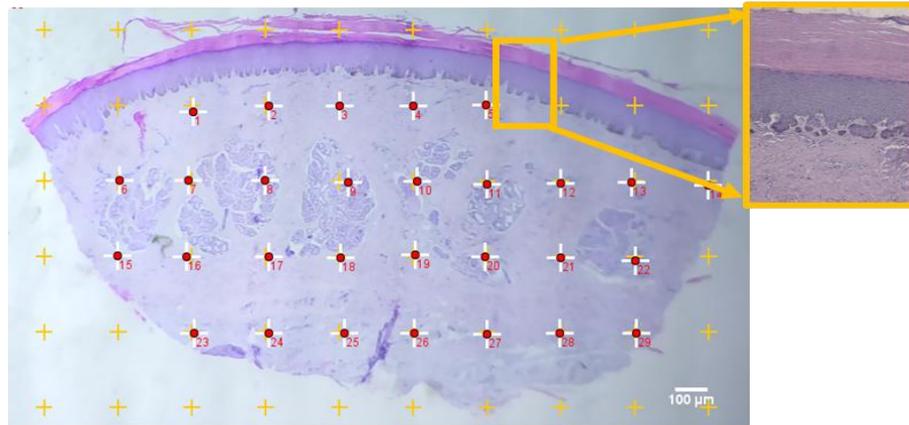
190

191

192

193

194



195

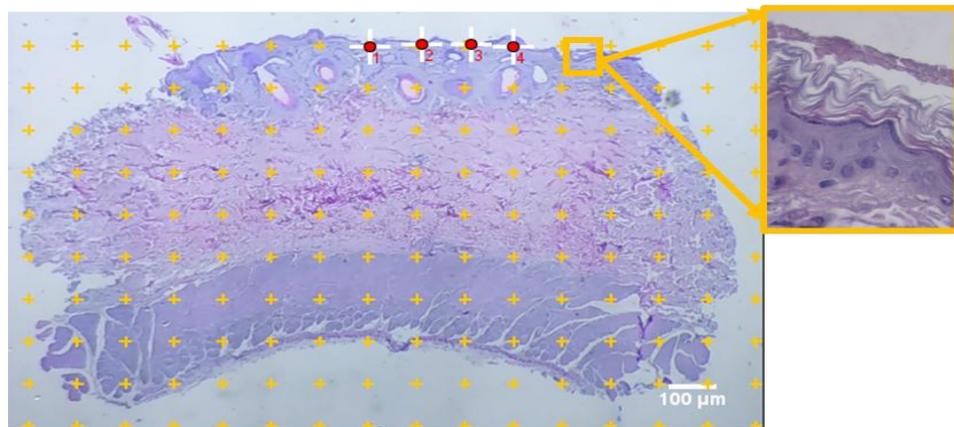
196

197

198

199

200



201

Figura 1: Fotomicrografia da área de biópsia cutânea de cutias (*Dasyprocta prinnolopha*), com sobreposição do sistema teste para contagem de pontos incidentes nas dérmicas (29 pontos) e epidérmicas (4 pontos), contados para estimar a variável ‘volume referência’ de cada camada.

202

203

204

### **Avaliação por microscopia de força atômica**

205

206

207

O processamento histológico da amostra foi realizado de forma convencional, por fixação, desidratação, diafanização e inclusão em parafina, conforme descrito previamente [38].

208

As amostras foram seccionadas com dois micrometros de espessura, sem coloração. As

209

secções das biópsias foram estendidas em lamínulas de 13 mm de diâmetro, incubadas em

210

estufa a 60° C por 30 minutos para desparafinização e em seguida, submersas em 30 ml de

211

Xilol sob suave agitação por 15 minutos. O Xilol foi removido com o auxílio de uma pipeta

212

de *Pasteur* e amostra reidratada em gradientes decrescentes de álcool etílico PA, 90%, 80% e

213

70%.

214 Utilizou-se um microscópio de força atômica Multimode<sup>®</sup> 8, Bruker<sup>®</sup>, no modo  
 215 *Quantitative Nanomechanics* para análise topográfica tridimensional dos cortes de dorso e  
 216 coxim de cutias machos e fêmeas, totalizando quatro amostras. Foram utilizadas sondas  
 217 modelo *Scanasyst Air*<sup>®</sup> (Figura 2), com constante de mola de 0,4 N/m, resolução de imagens  
 218 de 256 linhas por imagem e taxa de varredura de aproximadamente 0.5 hz.



230 *Figura 2. Sondas de microscopia de força atômica modelo Scanasyst Air..*

231

232 Adotou-se aumentos de 50, 30 e 15  $\mu\text{m}^2$  para avaliação das amostras. Utilizou-se três  
 233 varreduras com a sonda AFM para as camadas da epiderme e derme das amostras de dorso e  
 234 duas varreduras para os estratos córneo, interface córneo/granuloso (lúcido), granuloso,  
 235 espinhoso, basal e derme da região de coxim (pele espessa).

### 236 **Análise estatística**

237

238 Utilizou-se o software SAS<sup>®</sup>, aplicando-se análise de variância (ANOVA), visando  
 239 identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos independentes,

240 seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. Adotou-se um nível de rejeição da  
241 hipótese de nulidade de 5% ( $p \leq 0,05$ ) para ambas as análises.

## 242 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

243 Todos os animais recuperaram-se completamente e foram reintroduzidos ao rebanho.  
244 O protocolo anestésico dissociativo e infiltrativo local adotado, revelou-se seguro, conforme  
245 esperado, sem alterações dignas de nota dos parâmetros vitais e com rápida recuperação pós-  
246 anestésica. A segurança deste protocolo anestésico já havia sido demonstrada anteriormente  
247 em roedores [39]. Contudo, é relevante reiterar a segurança do mesmo, haja visto que animais  
248 silvestres criados em cativeiro podem apresentar alterações metabólicas secundárias  
249 decorrentes de estresse mediante manejo ou secundário a administração de fármacos [40].  
250 Felizmente, tais intercorrências não foram observadas neste estudo.

251 As lesões de biopsia apresentaram-se limpas, não exsudativas e cicatrizaram após 14  
252 dias. As amostras obtidas apresentaram diâmetro médio de  $4,45 \pm 1,10$  mm, com peso médio  
253 de  $0,035 \pm 0,014$ g. Após o processamento histológico, identificou-se redução do diâmetro e  
254 peso médio das amostras, as quais apresentaram  $3,45 \pm 0,89$ mm e  $0,027 \pm 0,011$ g,  
255 respectivamente. Tais observações eram esperadas, pois as amostras são desidratadas durante  
256 histotécnica, o que reduz medidas de diâmetro e peso. Além disso, a retração tecidual também  
257 colabora para este resultado, conforme descrições prévias [41].

258 Na avaliação histológica convencional, mediante coloração de hematoxilina e eosina,  
259 identificou-se epiderme pluriestratificada, evidenciando-se nitidamente os estratos córneo,  
260 granuloso, espinhoso e basal (Figura 3).

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

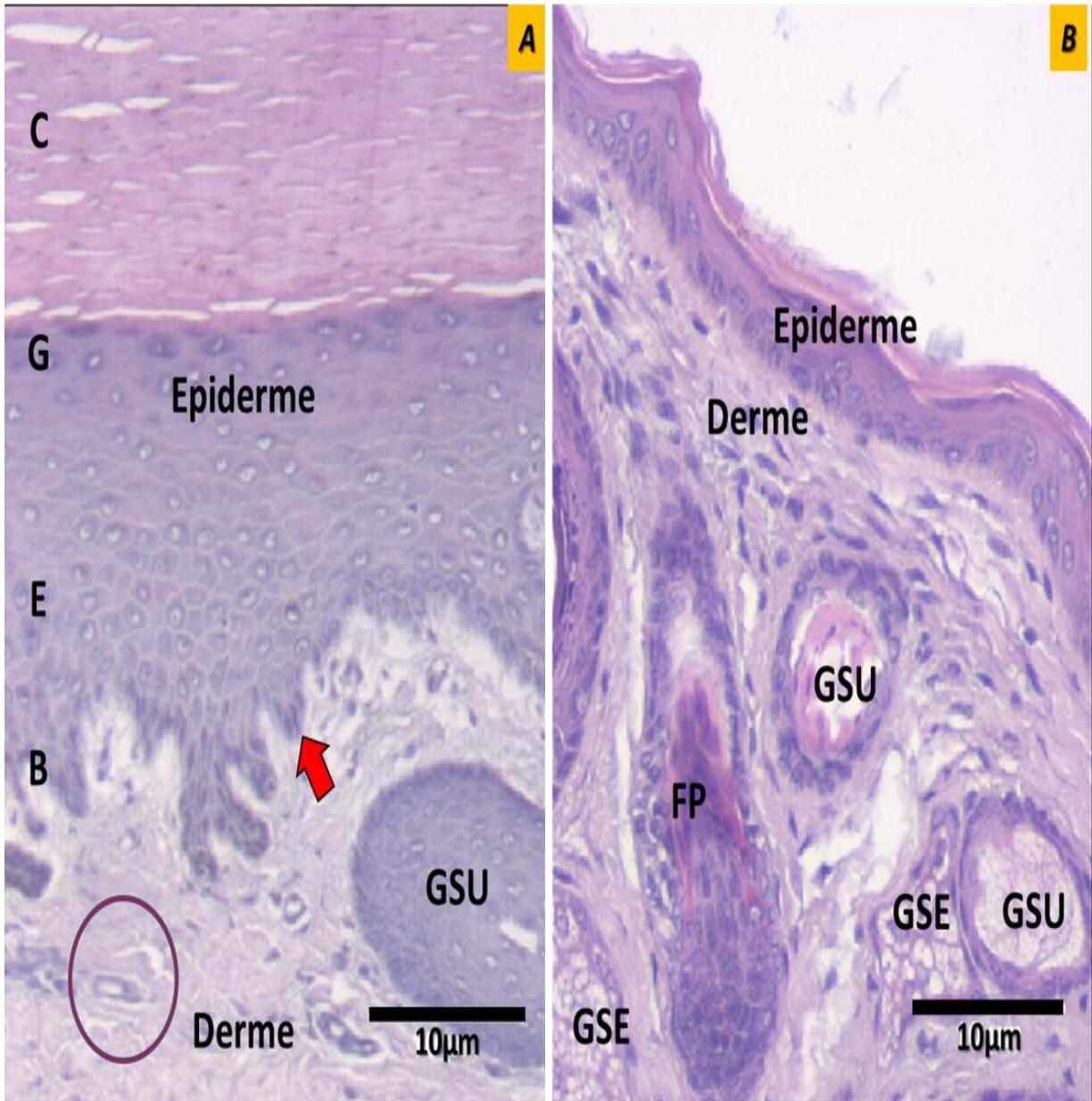
278

279

280

281

282



283

284

285

286

287

288

289

Figura 3: Fotomicrografia da pele saudável de cutia macho, adulta. Coloração em HE. A: Amostra de pele de coxim, evidenciando os estratos córneo (C), granuloso (G), espinhoso (E), basal (B), junção dermo epidérmica (seta) e capilar (circulo). B: Amostra de pele dorsal, evidenciando folículo piloso (FP), glândula sebácea (GSE) e glândula sudorípara (GSU).

Não foi observado estrato lúcido nas amostras analisadas por microscopia óptica, em coloração HE, em ambos os sexos. O estrato lúcido é bem desenvolvido nas regiões de coxim em roedores e cães, sendo menos desenvolvido em plano nasal e ausente nas demais regiões

290 destas espécies [42]. Como o estrato lúcido é formado por uma camada delgada de células  
291 achatadas, não é incomum não identifica-lo em amostras processadas convencionalmente,  
292 mesmo em pele espessa [42]. Em amostras de pele espessa de planta do pé em seres  
293 Humanos, por exemplo, o estrato lúcido pode não ser facilmente identificado pelas colorações  
294 convencionais [43, 44].

295 Identificou-se grande quantidade de glândulas sebáceas nas amostras de coxim, com  
296 morfologia simples, localizadas profundamente na derme reticular (Figura 4a). Este resultado  
297 contrasta com as observações de outros autores que não identificaram tais glândulas no coxim  
298 de cães [44]. Costumeiramente, apresentam-se em maior quantidade em áreas com menor  
299 densidade de pelos [45], mas na espécie cutia, tanto em machos quanto em fêmeas, as  
300 glândulas sebáceas foram observadas em todas as amostras de pele. Em amostras de pele fina,  
301 estas glândulas foram localizadas superficialmente em derme papilar, próximas aos folículos  
302 pilosos (Figura 4b). Resultados semelhantes foram descritos em pacas (*Cuniculus paca*  
303 *Linnaeus*) [46].

304 Como a cutia é uma espécie silvestre, que vive em ambientes tropicais, provavelmente  
305 a disposição contínua de glândulas sebáceas ao longo da pele fina e espessa seja uma  
306 adaptação evolutiva para proporcionar maior proteção física, microbiológica e química, haja  
307 visto que os ácidos graxos do sebo, como o linoleico, mirístico e palmítico, dentro outros,  
308 possuem atividade antimicrobiana e hidratante [46]. Embora a composição do produto das  
309 glândulas sebáceas não tenha sido avaliada neste estudo, parece-nos provável que tais  
310 inferências possam estar presentes. Obviamente, outros estudos, mais aprofundados, que  
311 quantifiquem e qualifiquem a produção sebácea de cutias são necessários para elucidar tais  
312 hipóteses.

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

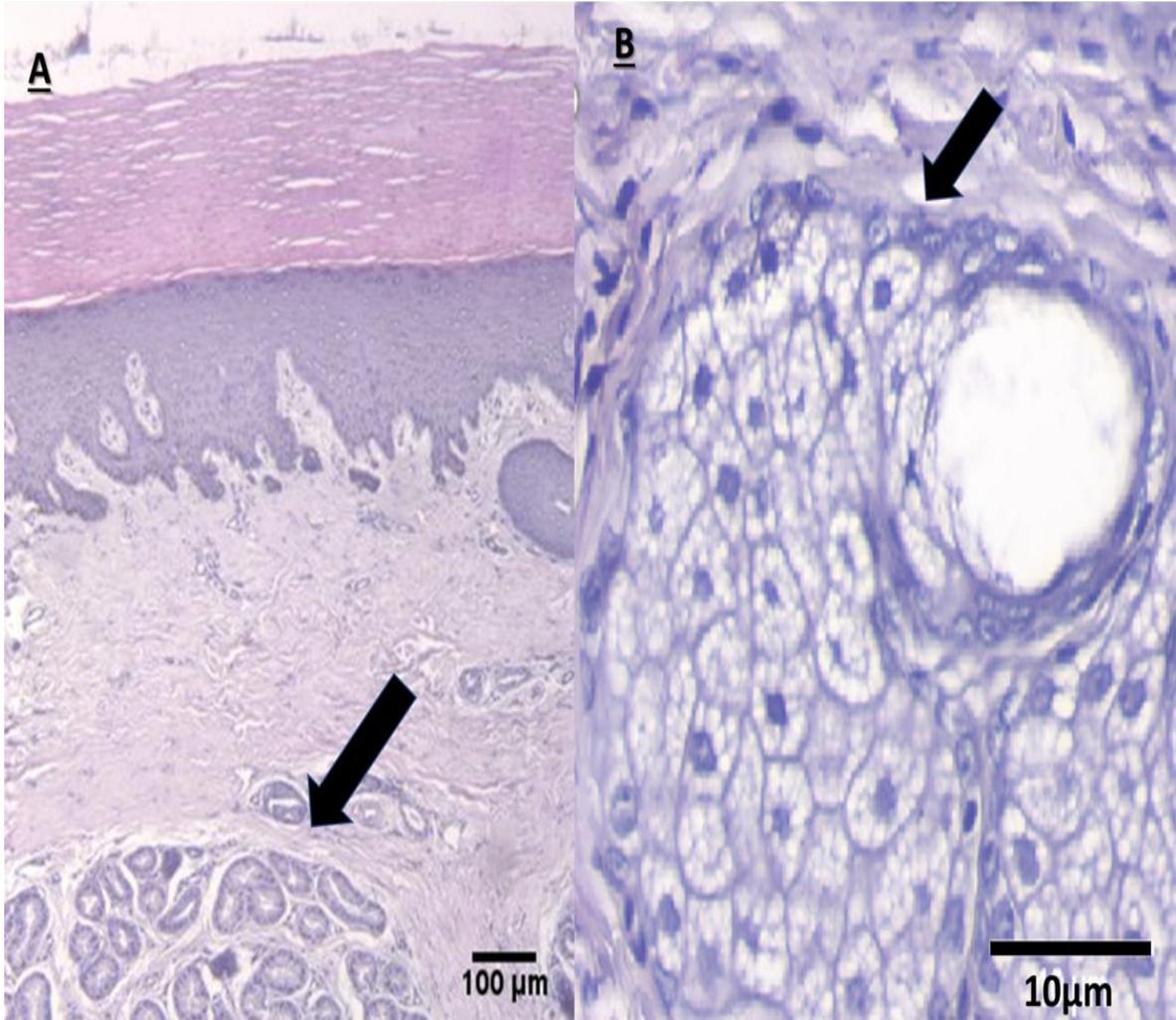
323

324

325

326

327



328

329

330

**Figura 4** Fotomicrografia da pele saudável de cutia macho, adulta. Coloração de HE. A: Amostra de pele de coxim, demonstrando a localização da glândula sebácea (seta) profundamente na derme reticular. B: Amostra de pele dorsal, evidenciando aspecto alveolar ramificado, em maior aumento, da glândula sebácea (seta). Avaliado sob luz branca.

331

332

333

334

335

336

337

338

Analogamente, as glândulas sudoríparas também foram identificadas em toda a pele das cutias avaliadas, independente do sexo. Na pele com pêlos foram identificadas glândulas sudoríparas apócrinas, com morfologia sacular típica, em derme papilar e nos coxins, glândulas écrinas, com morfologia enrolada (Figura 3a,b). Em pele espessa de coxim, as glândulas sudoríparas écrinas apresentaram-se em volume superior às apócrinas da pele fina, denotando hipertrofia evidente (Figura 3a). Identificou-se também que não havia correlação morfológica direta entre as glândulas écrinas e folículos pilosos, tal qual identificado entre glândulas apócrinas e folículos. Estes achados são discrepantes aos já descritos, nos quais não

339 foram identificadas glândulas sudoríparas em regiões pilosas de pacas (*Cuniculus paca*  
340 *Linnaeus*) [46,47]. Dada a proximidade filogenética entre cutias e pacas, surpreende-nos tais  
341 diferenças. Talvez a ausência de hábitos aquáticos em cutias contribua para a maior presença  
342 de glândulas sudoríparas nesta espécie, mas não se pode afirmar tal conjectura.

343       Quanto aos estratos cutâneos identificados, estes não diferiram quanto ao descrito para  
344 a maior parte dos mamíferos [44]. A camada córnea foi constituída por células sem núcleo e  
345 completamente achatadas em forma de lâminas sobrepostas (Figura 5). A camada granulosa  
346 foi caracterizada pela presença de células poligonais com núcleo central, achatadas, com a  
347 presença de grânulos intracitoplasmáticos (Figura 5). Estudos anteriores já haviam descrito  
348 que tais grânulos, em roedores [32], constituem-se em ceratina e acredita-se que ocorra da  
349 mesma forma nas cutias analisadas. Faz-se mister, entretanto, estudos químicos que  
350 esclareçam tais particularidades, doravante tais aspectos excedem os objetivos do presente  
351 trabalho. Cabe salientar que, reiterando tais aspectos morfológicos, identificou-se que os  
352 grânulos observados eram dispostos extracelularmente e linearmente, como uma barreira de  
353 proteção no estrato avaliado (Figura 5).

354       A camada espinhosa foi formada por células cuboides, com núcleo central e pequenas  
355 expansões no citoplasma, conferindo-lhe aspecto que nomeia o referido estrato. A camada  
356 basal foi o estrato mais profundo da epiderme, estabelecendo área linear epidermio-dermo-  
357 juncional formada por uma única fileira de células prismáticas (Figura 3a,b).

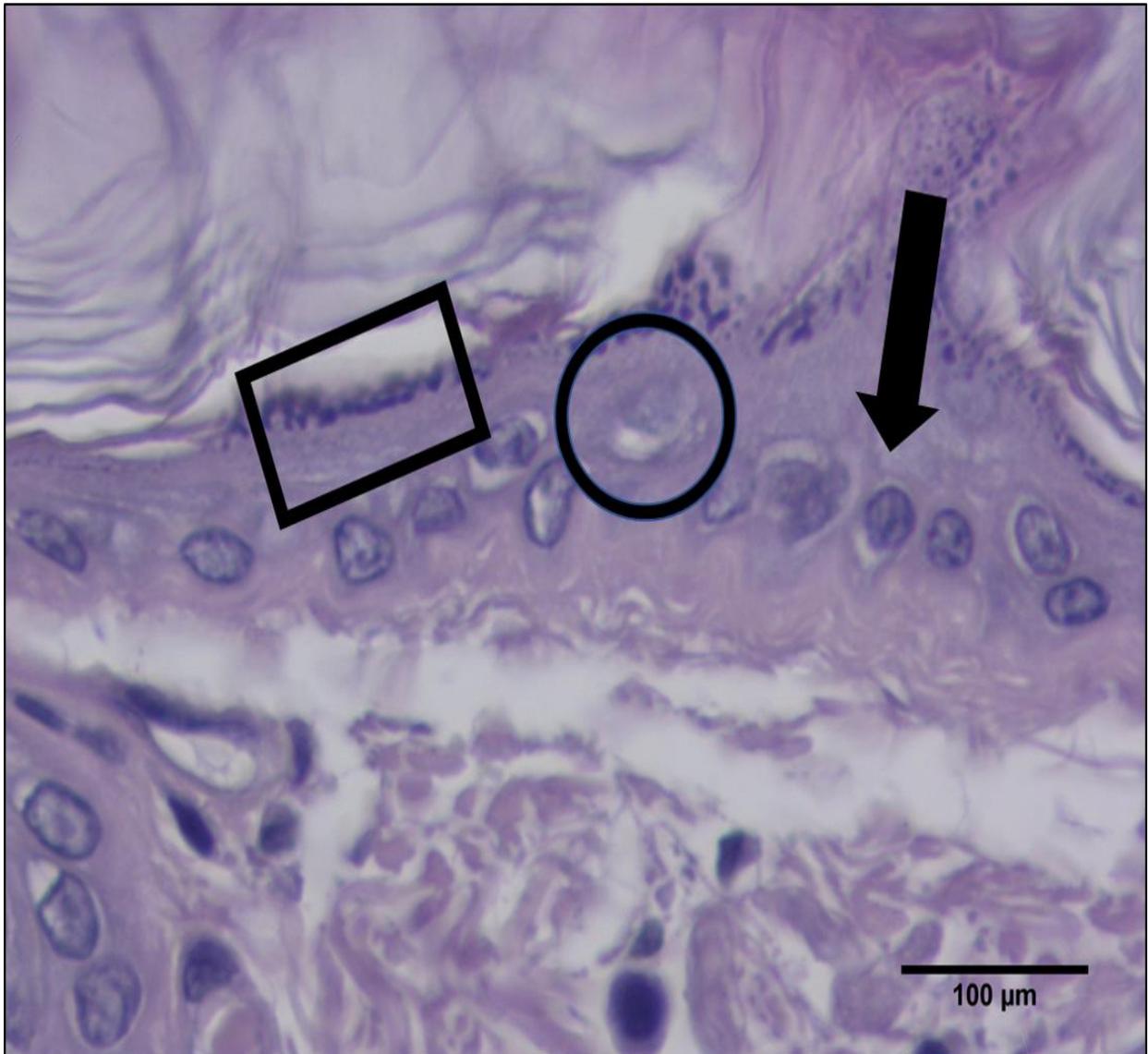
358       Identificaram-se células de Langerhans e os melanócitos, com morfologia  
359 arredondada, localizadas na camada basal da epiderme (Figura 5), tal qual identificado em  
360 outras espécies animais [48].

361

362

363

364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379



380 **Figura 5** Fotomicrografia da pele saudável de cutia macho, adulta. Coloração de HE: camada granular e grânulos  
381 (retângulo), Célula de Langherans (circulo) e melanócito (Seta) em microscopia ótica.

382 O tempo de análise por AFM variou por área entre 10 e 50 minutos e obtiveram-se  
383 imagens com 256 linhas de resolução. Segundo estudos progressos, tal resolução é a ideal  
384 para análise de imagens de tecidos que apresentem amplitude de variação topográfica [16,17].  
385 A resolução obtida permitiu delimitar e mensurar estruturas teciduais específicas, mas, em  
386 contrapartida, limitou a área de observação e obtenção de varreduras topográficas amplas.

387 A avaliação nanométrica tridimensional por força atômica, favoreceu a identificação  
388 das relações topográficas ultra estruturais entre os estratos cutâneos. Neste aspecto, a

389 epiderme das cutias não apresenta topografia pavimentosa linear e uniforme, como a  
390 histologia bidimensional poderia sugerir. Mas diametralmente, evidenciou-se que entre o  
391 estrato basal e a camada córnea há uma diferença de profundidade de  $0,96 \pm 1,04 \mu\text{m}$ , que se  
392 alterna irregularmente, como mosaico, entre as células dos estratos e entre os estratos. Tais  
393 diferenças provavelmente indicam o estágio de desenvolvimento do ceratinócito e o volume  
394 do estrato no qual está inserido (Figura 6f).

395       Em dermatologia animal, as características de desenvolvimento dos ceratinócitos são  
396 bem documentadas, sendo amplamente descritas as variações moleculares da maturação dos  
397 diferentes estágios de ceratinas intracitoplasmáticas e as alterações morfológicas celulares  
398 decorrentes destas, como redução do volume celular e redução da elasticidade do  
399 citoesqueleto [49]. Tais condições, podem ser responsáveis pela identificação de uma  
400 topografia nanométrica longitudinal irregular, com variações de profundidade que se  
401 acentuam diretamente proporcional à proximidade com a camada basal, a zona limítrofe entre  
402 derme e epiderme. Como a membrana basal é composta por uma camada singular de células  
403 indiferenciadas, mas comprometidas com a diferenciação ectodermal, de morfologia cuboide  
404 e citoplasma abundante, em comparação aos estratos granuloso e espinhoso, por exemplo,  
405 formados por três a cinco segmentos de ceratinócitos justapostos e sobrepostos, pode-se  
406 inferir como possível e provável que tais condições influenciem o volume do estrato e, por  
407 seguinte, a topografia ultraestrutural da mesma.

408       Em pele fina, tanto em machos quanto fêmeas, o estrato córneo apresentou  $30,8 \pm 6,4$   
409  $\mu\text{m}$  de comprimento longitudinal médio (Figura 6a,b), enquanto em pele espessa, não foi  
410 possível mensurar completamente o estrato córneo, pois na escala de  $10 \mu\text{m}$ , não foi  
411 visualizado os limites do mesmo (Figura 6a). Contudo, devido a espessura elevada dos coxins,  
412 a mensuração parcial do estrato córneo revelou  $42,54 \pm 10,2 \mu\text{m}$  de comprimento longitudinal  
413 médio, superior a todo o comprimento do estrato em pele fina (Figura 6f).

414

415

416

417

418

419

420

42

42

42

42

42

42

427

42

42

43

43

43

43

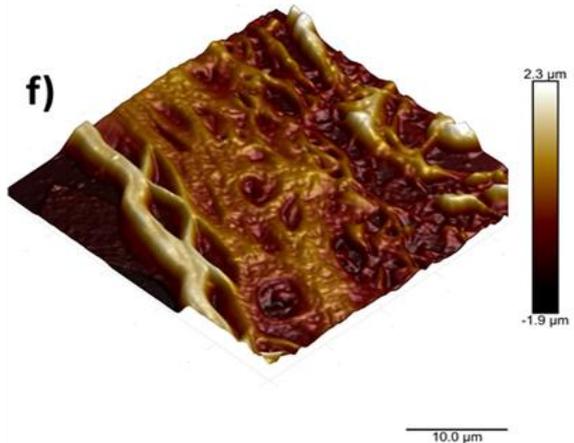
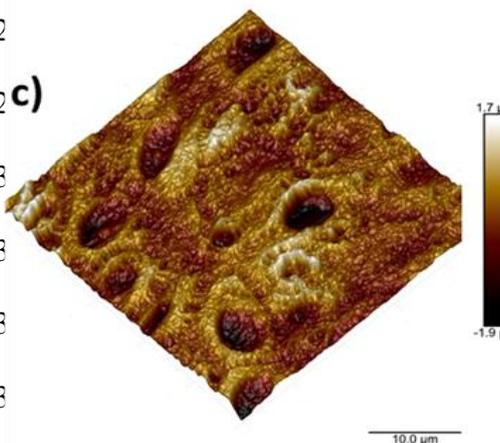
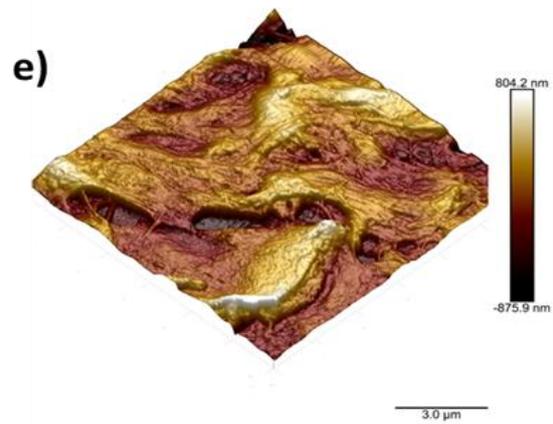
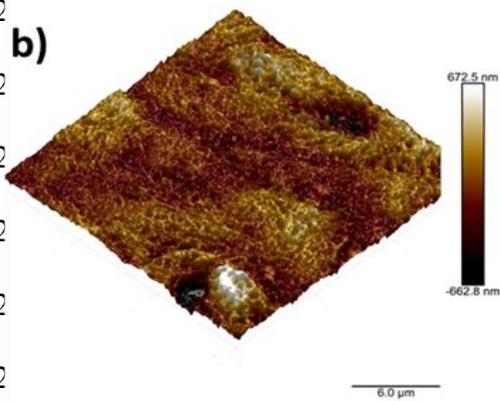
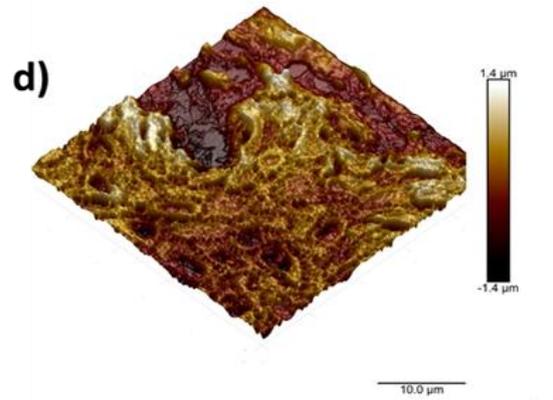
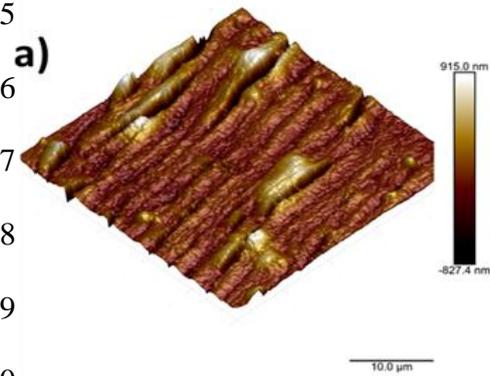
43<sup>4</sup>

43

43

437

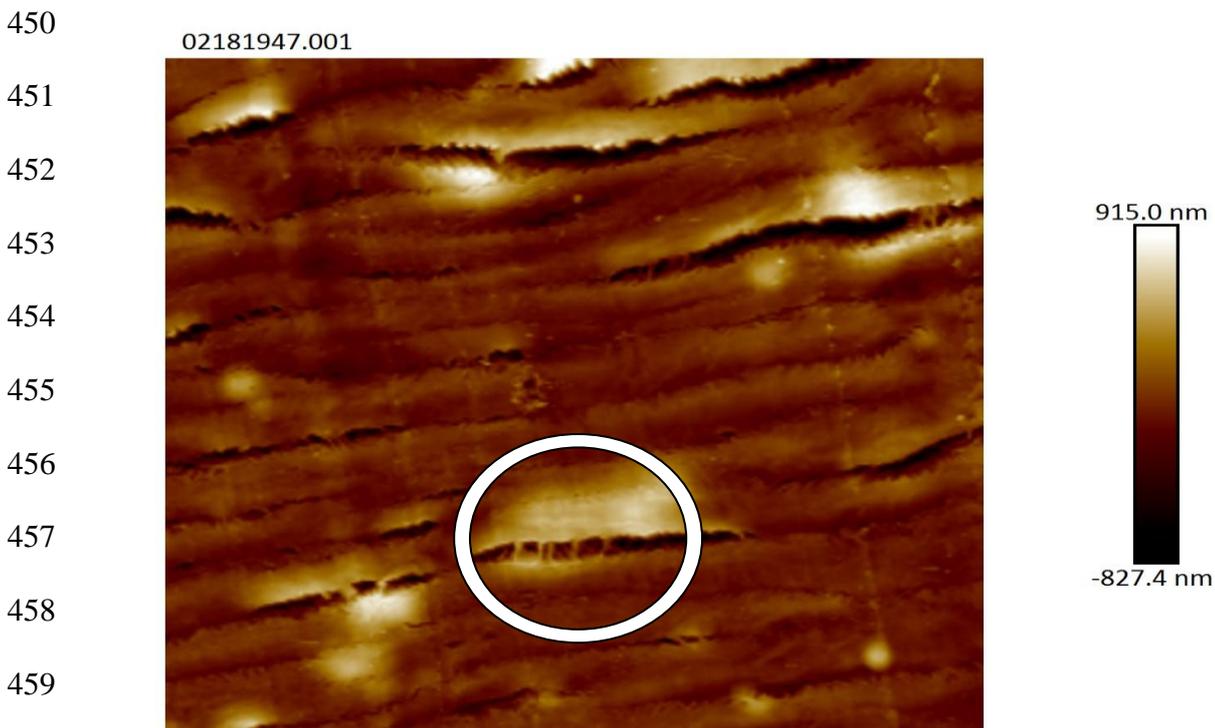
438



**Figura 6** Ultra fotomicrografia de varredura tridimensional de amostras de pele saudável de cutias, demonstrando a organização do tecido e amplitude topográfica entre nanômetros e micrômetros. Em ângulos longitudinais de varredura de sonda, identifica-se A: estrato cutâneo de pele espessa, B: estrato córneo, C: estrato granuloso, D: estrato espinhoso, E: estrato basal ou germinativo, F: Epiderme e derme de pele fina em região dorsal. Microscopia de força atômica.

439 Tais resultados sugerem a relevância da função biomecânica dos coxins plantares,  
440 sobretudo em espécies de elevada rusticidade, como as cutias. A elevada espessura do estrato  
441 córneo dos coxins plantares, avascularizada, de baixa permeabilidade, provavelmente  
442 contribui para os efeitos físicos de proteção mecânica e térmica, favorecendo a absorção de  
443 impacto em superfícies irregulares, resistência abrasiva ao ambiente e proteção térmica da  
444 epiderme e derme à temperatura elevada do solo. Curiosamente, cutias possuem o hábito de  
445 bater os coxins contra o solo quando se sentem intimidadas [12], implicando em provável  
446 função social comportamental da morfologia dos coxins.

447 Os corneodesmossomos apresentaram-se evidentes entre os corneócitos, na forma de  
448 filamentos ou projeções entre as camadas de células ceratinizadas justapostas no estrato  
449 córneo (Figura 7).



460 **Figura 7:** Fotomicrografia da área de biopsia de pele espessa de cutia, em região de estrato  
461 córneo. Imagens nanométricas de corneodesmossomos (circulo), entre as camadas do  
462

463 Isso demonstra que, embora o corneócito tenha perdido a maioria das organelas  
464 intracelulares e não apresentem atividade metabólica relevante [50], os corneodesmosomos  
465 permanecem ativos e desempenham função preponderante para manter a coesão celular.  
466 Permanece inconclusivo se os corneodesmosomos identificados no estrato córneo mantem-se  
467 unidos apenas de forma estrutural ou se ainda há afinidade química atuante sobre o  
468 citoesqueleto.

469 O estrato lúcido foi identificado na microscopia de força atômica apenas nas amostras  
470 de pele espessa de coxim, localizado logo abaixo do estrato córneo, como uma camada  
471 translúcida com  $8,36 \pm 2,24$   $\mu\text{m}$  de comprimento longitudinal médio (Figura 8b). Como não foi  
472 identificado nas amostras ultramicroscópicas de pele fina e na microscopia óptica  
473 bidimensional, acredita-se que este estrato não seja facilmente identificado em menores  
474 volumes de tecido, tal qual discutido anteriormente e referenciado em estudos pregressos [42,  
475 43,44].

476 Em pele fina, tanto em machos quanto fêmeas, o estrato granuloso apresentou  $7 \pm 1,06$   
477  $\mu\text{m}$  de comprimento longitudinal médio e o espinhoso,  $11,5 \pm 1,21$   $\mu\text{m}$ . De forma análoga ao  
478 estrato córneo, em pele espessa não foi possível mensurar completamente os referidos  
479 estratos, pois na escala de 10  $\mu\text{m}$ , não foi visualizado os limites dos mesmos.

480 No estrato granuloso evidenciou-se topografia com diferença de profundidade de  
481  $1,9 \pm 0,2$   $\mu\text{m}$ , enquanto no estrato espinhoso identificou-se diferença de  $2,1 \pm 0,15$   $\mu\text{m}$ ,  
482 denotando maior amplitude entre os ceratinócitos espinhosos. Tanto o estrato granuloso,  
483 quanto espinhoso apresentaram superfície topográfica irregular e granular, com baixa  
484 definição de limites citoplasmáticos no estrato granuloso, conferindo-lhe aspecto contínuo.  
485 Contrariamente, os ceratinócitos do estrato espinhoso apresentaram clara distinção de limites  
486 citoplasmáticos e evidentes projeções intercelulares identificadas como tonofibrilas e  
487 corneodesmosomos. A mensuração média dos corneodesmosomos do estrato espinhoso foi

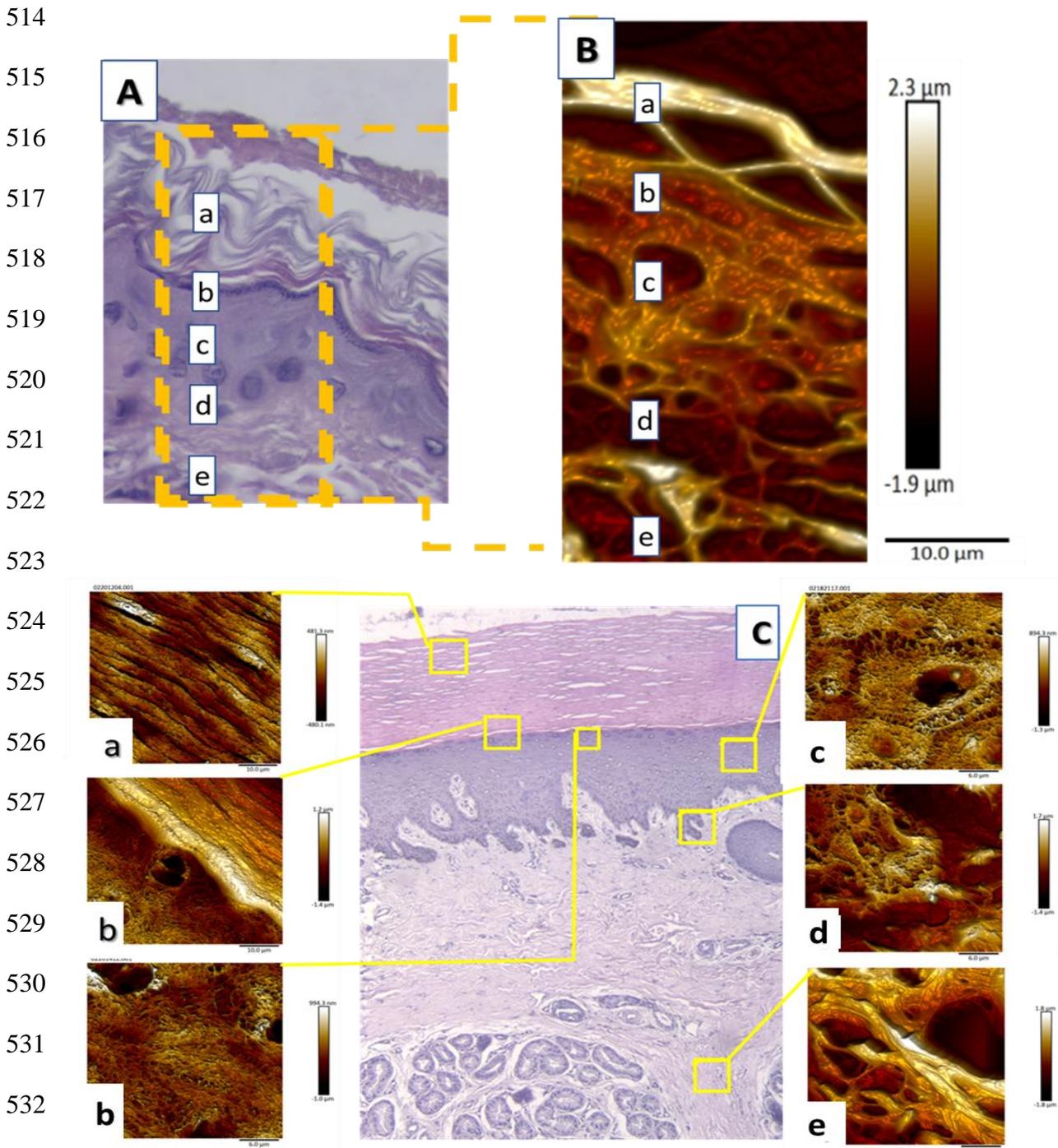
488 de 0,5  $\mu\text{m}$  (Figura 8b,c) e as células apresentaram-se justapostas. Não foram identificadas, até  
489 o presente momento, publicações científicas que tenham descrito tais estruturas com o  
490 requinte de detalhes tridimensionais de profundidade e forma como no presente trabalho, o  
491 que obriga-nos a aguardar a reprodutibilidade da técnica em outras espécies e na cutia, para  
492 assegurar tais descobertas em definitivo. Por seguinte, as evidências ultramicroscópicas  
493 sugerem que o estrato espinhoso possui organização dinâmica, não linear e não uniforme de  
494 forma completamente distinta ao identificado na microscopia bidimensional.

495 As diferenças entre tonofibrilas e corneodesmossomos, em diferentes populações de  
496 ceratinócitos foram inferidas empiricamente, sem descrições prévias que permitissem  
497 comparações, baseado nas proporções dessas estruturas. Tais proporções tornam-se evidentes  
498 nas imagens obtidas do estrato basal (Figura 8d), no qual os prováveis corneodesmossomos  
499 apresentam-se como projeções celulares lateralizadas e em organização espiralada,  
500 completamente distintas das projeções alongadas das prováveis tonofibrilas tão evidentes no  
501 estrato espinhoso (Figura 8c).

502 Estudos anteriores já haviam determinado que as tonofibrilas são constituídas de  
503 feixes intermediários de ceratina [50], mas não foram encontradas informações em literatura  
504 científica sobre a disposição dos mesmos, o que realça a relevância das imagens descritivas  
505 obtidas e da descrição qualitativa.

506 A diferença de profundidade média do estrato basal foi de  $3,1\pm 0,1\mu\text{m}$  e o  
507 comprimento longitudinal médio de  $5,06\pm 0,2\mu\text{m}$ . Observou-se maior organização que o  
508 estrato espinhoso, sem evidências de sobreposição celular, mas com intensa projeção de  
509 estruturas morfológicamente compatíveis com tonofibrilas e corneodesmossomos, tal qual o  
510 estrato espinhoso. Curiosamente, apesar do estrato basal apresentar menor comprimento que o  
511 espinhoso, foi identificado maior densidade celular. Provavelmente haja maior atividade

512 mitótica nesta camada, decorrente da atividade da população de células indiferenciadas que  
 513 mantém mitoses assimétricas para prover os estratos acima.



533 **Figura 8** Fotomicrografia da área de biopsia de pele fina (A) e pele espessa (C) de cutias corado pela  
 534 técnica de HE, identificando seus estratos cutâneos (a) estrato córneo, (b) estrato granuloso (c) estrato  
 535 espinhoso (d) estrato basal ou germinativo (e) derme e suas respectivas imagens nanométricas  
 536 tridimensionais e amplitudes topográficas entre nanômetros e micrômetros, obtidas por microscopia de  
 537 força atômica.

536

537 O estrato basal apresentou-se com predominância de células pequenas e poliédricas,  
538 intercaladas com células grandes e arredondadas, medindo  $6,6\pm 0,1 \mu\text{m}$  x  $4,4\pm 0,2 \mu\text{m}$ . As  
539 menores células do estrato possuíam  $2,2\pm 0,1 \mu\text{m}$  x  $3,96\pm 0,1 \mu\text{m}$ , evidenciando a discrepância  
540 entre os tamanhos celulares identificados (Figura 8d).

541 Tais diferenças entre diâmetros celulares já haviam sido descritas em dermatologia  
542 veterinária [51]. Segundo estes autores, as células mononucleares redondas do estrato são  
543 melanócitos intercalados, os quais possuem dimensões superiores às demais. Infelizmente,  
544 embora tenha-se identificado células com topografia condizente com melanócitos, não foi  
545 possível distinguir os tonofilamentos melanocíticos para citocrinia, dos demais tonofilamentos  
546 presentes nas amostras analisadas. Posteriormente pretende-se mensurar todos os  
547 tonofilamentos de grupos de células, por estrato, sob diferentes ângulos das sondas de  
548 microscopia por força atômica para tentar agrupar tais estruturas por suas dimensões  
549 nanométricas.

550 A avaliação ultraestrutural dos anexos cutâneos da derme, tanto em pele fina quanto  
551 espessa, confirmaram as observações obtidas pela microscopia óptica bidimensional. As  
552 cutias apresentaram grande quantidade de glândulas sebáceas na derme reticular e glândulas  
553 sudoríparas apócrinas e écrinas.

554 As glândulas sudoríparas foram identificadas como estruturas curvilíneas, de  
555 superfície irregular, com diferença de profundidade de  $3,4\pm 1,1 \mu\text{m}$ , dispostas de forma tubular  
556 ou colunar ramificadas, sem distinção evidente de bordas. Estudos anteriores em microscopia  
557 eletrônica já haviam descrito que essas estruturas são definidas como rolos secretórios  
558 compostos de células mioepiteliais fusiformes [46]. Os limites citoplasmáticos referidos pelos  
559 autores não foram identificados no presente trabalho, mas evidenciou-se que, em cutias, os  
560 rolos secretórios localizam-se entre células cuboides e alongadas. Como há perda de líquido  
561 intracelular durante o processamento das amostras, os espaços celulares da glândula conferem

562 aspecto trabecular ao tecido, que na projeção tridimensional da imagem revela-se como  
563 sinuosidades que acompanham as dimensões celulares (Figura 9 B I, II).

564         Similarmente, as glândulas sebáceas foram identificadas com morfologia alveolar  
565 ramificada, separadas por septos irregulares, com diferença de profundidade de  $2,7\pm 0,8$   $\mu\text{m}$   
566 (Figura 9 C I, II). Descrições prévias destas glândulas em diversas espécies, utilizando  
567 microscopia eletrônica de varredura, identificaram que os septos irregulares visualizados  
568 constituem-se numa fileira simples de células basais responsáveis pela produção sebácea [42].  
569 Na microscopia de força atômica, as células basais apresentam-se como uma estrutura  
570 contínua, com limites indistinguíveis, que elevam-se cerceando as zonas alveolares.

571         A derme foi avaliada em amostras de escala de 6  $\mu\text{m}$ , evidenciando-se Substância  
572 amorfa de matriz extracelular, em padrão desorganizado (Figura 9AII). Não foi possível  
573 identificar as fibras dérmicas neste estudo, pela necessidade de utilização de sondas de AFM  
574 com maior área de varredura. Pretende-se prosseguir com esta pesquisa e caracterizar as fibras  
575 dérmicas, vasos e plexos nervosos da derme posteriormente.

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

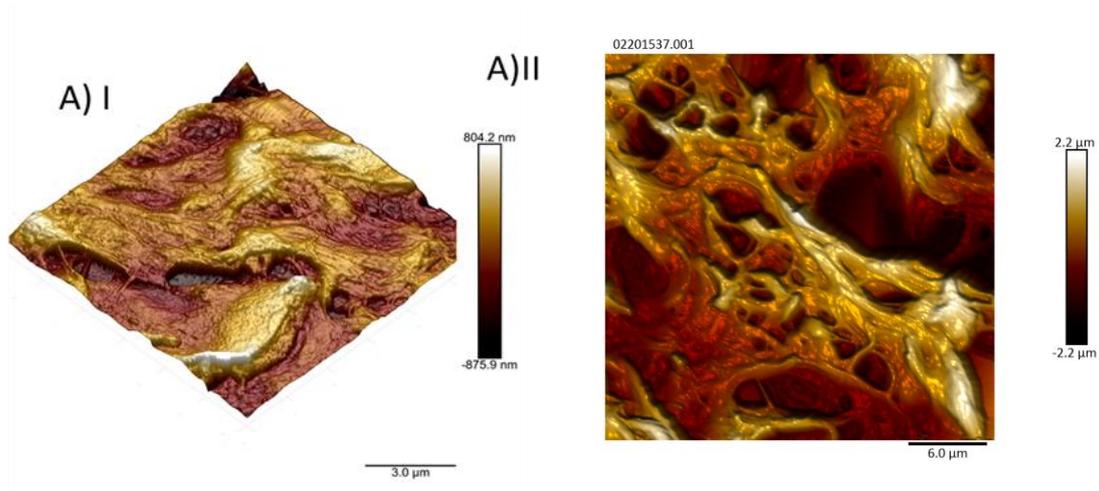
590

591

592

593

594



595

596

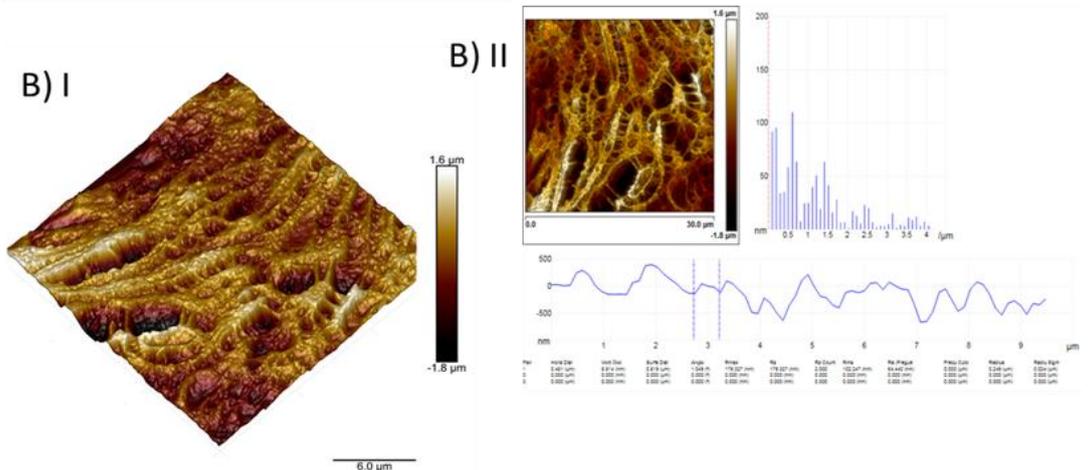
597

598

599

600

601

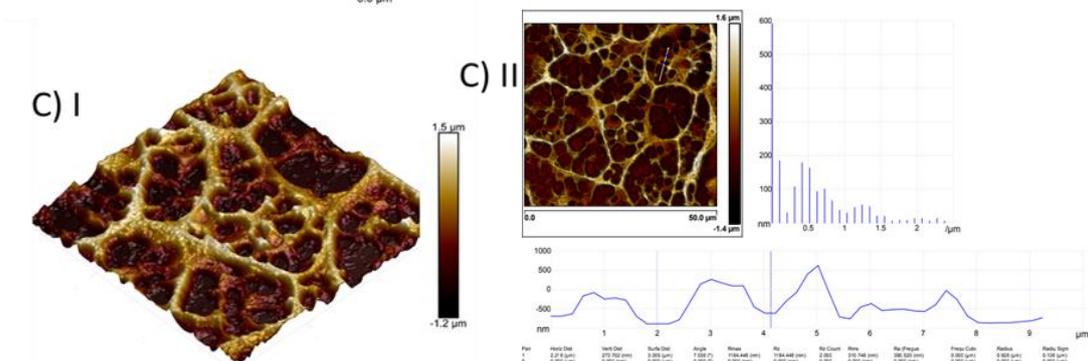


602

603

604

605



606

607

608

609

**Figura 10** Ultra fotomicrografia de varredura tridimensional de amostras de pele saudável de cutias, demonstrando derme e anexos e suas respectivas amplitudes topográficas em nanômetros e micrômetros. AI: Ângulo longitudinal de sonda em derme reticular, AII: Ângulo longitudinal de sonda demonstrando abundante substância amorfa extracelular em derme reticular. BI: Ângulo transversal de sonda em fragmento de 6µm de uma glândula sudorípara denotando organização longilínea tubular, BII: Ângulo longitudinal de sonda demonstrando aspecto tubular ramificado de glândula sudorípara. CI: Ângulo transversal de sonda em glândula sebácea. CII: Ângulo longitudinal de sonda em glândula sebácea. Em ambos, identifica-se organização alveolar ramificada separada por septos elevados e bem circunscritos. Imagens por microscopia de força atômica.

610 A avaliação estereológica das amostras de pele saudável de cutias não apresentaram  
 611 diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os sexos, possuindo machos e fêmeas volumes totais  
 612 similares de epiderme e derme (Tabela 1).

613

614 Tabela 1: Amostras de 6mm da pele saudável de cutias ( $n=6$ ) machos e fêmeas. Valores  
 615 médios estereológicos de volume epidérmico (V.Epi) e dérmico (V.Der).

Parâmetros Morfológico	Macho	Fêmea	Significância
V. Epi (mm <sup>3</sup> )	3,743± 3,5 (a)	2,930± 3,1 (a)	P>0,05
V. Der (mm <sup>3</sup> )	18,435±10,9 (b)	14,334± 5,4(b)	P>0,05

616 \*Valores com letras diferentes diferem entre si ao teste de Tukey a 5% de probabilidade

617

618 Contudo, identificou-se diferenças significativas entre as camadas da pele ( $p<0,05$ ),  
 619 possuindo a derme maior volume total que a epiderme. Esta, possuiu aproximadamente cinco  
 620 vezes mais volume que epiderme, ou seja, 84% do volume referente às amostras de 6mm  
 621 analisadas da pele de cutias é constituída de derme e apenas 16% equivale a epiderme (tabela  
 622 1). Analogamente à análise da densidade do volume da epiderme e derme, não foram  
 623 identificadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os sexos, mas persistiram diferenças  
 624 significativas ( $p<0,05$ ) entre estas camadas (Tabela 2).

625

626 Tabela 2: Valores médios estereológicos para as variáveis volume Cavalieri epidérmico, na  
 627 avaliação de biopsias cutâneas em cutias, ( $n=6$ ), entre as diferentes regiões.

Parâmetros Morfológico	V. Epi (mm <sup>3</sup> )	V.Der (mm <sup>3</sup> )
Coxim	8,4100± 0,92 (a)	22,037± 4,4 (b)
Joelho	2,2250± 0,37 (c)	17,575± 4,5 (d)
Ventre	1,4517± 2,4 (e)	13,750± 16,0(f)
Dorso	1,2583± 0,38(g)	12,157± 1,9 (h)

635 \*Valores com letras diferentes diferem entre si ao teste de Tukey a 5% de probabilidade

636 Tais achados corroboram relatos prévios que identificaram estas diferenças em ratos  
637 [32, 52]. Ademais, estas diferenças refletem a característica morfofuncional da pele, a qual,  
638 nos mamíferos superiores, apresenta a derme em maior volume por se tratar de tecido  
639 conectivo de sustentação e nutrição e a epiderme, em menor volume, representando a  
640 linhagem ectodermal cujas principais funções são de barreira física e resistência abrasiva  
641 [24,25]. Obviamente, não se pretende com tal reducionismo desconsiderar as inúmeras  
642 atividades metabólicas e imunológicas da pele, tanto em derme quanto em epiderme, mas  
643 apenas estabelecer o silogismo que correlaciona o volume da camada com a função  
644 preponderante da mesma.

645 Aparentemente, o metabolismo androgênico parece não influenciar o volume dos  
646 tecidos cutâneos, ao contrário do que os hábitos de caça e demarcação de território exercidos  
647 predominantemente pelos machos da espécie cutia poderiam sugerir como adaptação  
648 evolutiva funcional. As fêmeas apresentaram grande similaridade quanto aos volumes da  
649 epiderme e derme dos machos, demonstrando que, para cutias criadas em cativeiro, o sexo é  
650 fator de baixa relevância ( $p>0,05$ ) para o volume das camadas da pele.

651 As análises de densidade de volume, referentes às amostras de 6 mm analisadas,  
652 revelaram diferenças significativas quanto ao sexo dos animais ( $p<0,05$ ), entre os estratos  
653 epidérmicos de uma mesma região corpórea avaliada. Contudo, demonstraram-se similares  
654 ( $p>0,05$ ), em amostras de pele fina, quando comparado o mesmo estrato entre as distintas  
655 regiões corpóreas analisadas (Tabela 3).

656

657

658 Tabela 3: Valores médios estereológicos para volume total de cada estrato epidérmico, em  
659 amostras de biopsias cutâneas de cutias, (n=6), entre machos e fêmeas.

<b>Estrato epidérmico</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Significância</b>
<b>Córneo (mm<sup>3</sup>)</b>	1,2208±1,2(a)	1,3867± 1,4 (a)	P>0,05
<b>Granuloso (mm<sup>3</sup>)</b>	0,6125±0,6 (b)	0,6033± 0,6(b)	P>0,05
<b>Espinholoso (mm<sup>3</sup>)</b>	0,9067±0,9 (c)	0,9658± 0,9(c)	P>0,05
<b>Basal (mm<sup>3</sup>)</b>	0,9533±0,8 (d)	0,7858± 0,7(d)	P>0,05

660 \*Valores com letras diferentes diferem entre si ao teste de Tukey a 5% de probabilidade  
661

662 Para pele espessa (coxim), identificou-se diferenças significativas (p<0,05) tanto entre  
663 os estratos entre si, quanto entre estes e as regiões corpóreas avaliadas (Tabela 4).

664

665 Tabela 4 Valores médios estereológicos para o volume total de cada estrato epidérmico, na  
666 avaliação de biopsias cutâneas de cutias (n=6), entre quatro regiões distintas.

<b>Estrato epidérmico</b>	<b>Dorso</b>	<b>Ventre</b>	<b>Joelho</b>	<b>Coxim</b>
<b>Córneo (mm<sup>3</sup>)</b>	0,7700±0,90(a)	0,7867± 0,84 (a)	0,5217± 0,20(a)	3,1367± 0,53 (b)
<b>Granuloso (mm<sup>3</sup>)</b>	0,4500± 0,53 (c)	0,3467± 0,32(c)	0,2650± 0,07(c)	1,3700±0,49 (d)
<b>Espinholoso (mm<sup>3</sup>)</b>	0,6650±0,84 (e)	0,4950±0,51 (e)	0,3683± 0,12(e)	2,2167± 0,18(f)
<b>Basal (mm<sup>3</sup>)</b>	0,6433±0,69 (g)	0,6183± 0,73 (g)	0,3550±0,10 (g)	1,8617±0,34 (g)

667 \*Valores com letras diferentes diferem entre si ao teste de Tukey a 5% de probabilidade  
668

669 As diferenças estruturais, no presente trabalho identificadas em volume de estrato, já  
670 haviam sido descritas previamente em outras espécies [53]. Tais diferenças representam tanto  
671 o estágio de maturação e desenvolvimento dos ceratinócitos, quanto da composição e função  
672 dos mesmos na mecanobiologia cutânea.

673 Tal silogismo baseia-se no conhecimento prévio que o volume individual dos  
674 ceratinócitos diminui proporcionalmente ao aumento da produção e maturação de  
675 citoceratinas [53]. Estas citoceratinas são utilizadas como marcadores da senescência de  
676 ceratinócitos [54] e conseqüentemente, evolução do processo de cornificação [55]. À medida  
677 que a ceratogênese progride, acentua-se a degeneração de organelas intracitoplasmáticas e o  
678 volume celular reduz. A manutenção da função de resistência abrasiva da epiderme dependerá  
679 então de uma maior concentração de ceratinócitos por camada (55). Neste estudo, identificou-  
680 se que a densidade de volume dos estratos epidérmicos aumenta a partir do estrato basal ao  
681 córneo, pois embora as análises de microscopia de força atômica tenham indicado que o  
682 volume individual dos ceratinócitos basais sejam superiores, a estereologia revela que estratos  
683 acima do basal possuem volume total e densidade de volume superiores, provavelmente  
684 decorrentes da maior concentração celular.

685 Contrariamente, ainda que os volumes dos estratos difiram entre si, em pele fina, não  
686 diferem entre as regiões cutâneas avaliadas. Provavelmente, tal circunstancia represente a  
687 baixa relevância da pele fina como agente físico para resistência abrasiva, haja visto que, em  
688 animais, normalmente a pele fina é coberta de pêlos, os quais, dependendo da espécie, podem  
689 estar organizados como manto e submanto [56], elevando a proteção cutânea.

690 Para pele espessa, os dados obtidos sugerem o inverso. Como normalmente esta  
691 diferenciação do tecido cutâneo localiza-se em regiões glabras, submetidas ao estresse  
692 biomecânico de abrasão, a descamação do estrato córneo pode tornar-se mais acentuada,  
693 exigindo maior velocidade de reposição celular. Tal inferência pode ser defendida avaliando  
694 as densidades e volumes dos estratos, os quais tornam-se maiores na região de pele espessa,  
695 como identificado no presente trabalho. Corrobora a esta observação, os dados micrométricos  
696 deste estudo, que identificaram maior quantidade de tonofilamentos entre ceratinócitos de  
697 pele espessa, sugerindo maior coesão celular, tal qual observado em outras espécies [48].

## 698 **CONCLUSÃO**

699

700

O presente estudo é o primeiro em quantificar tridimensionalmente elementos da pele saudável de cutias (*Dasyprocta prinnolopha*) do Nordeste do Brasil, criadas em cativeiro.

701

702

A pele de cutias não apresenta diferenças quanto ao sexo. Ademais, apresenta estratos e camadas bem delimitados, cujos volumes são similares entre as amostras de pele fina em diferentes regiões anatômicas. Os resultados sugerem que a cutia é um modelo potencial para estudos dermatológicos por apresentar homogeneidade do tecido cutâneo entre as regiões corpóreas e cuja estratificação epitelial apresenta volume e morfologia distintos entre si, o que poderá favorecer a aplicação futura de métodos sistemáticos de investigação.

703

704

705

706

707

708

## 709 **AGRADECIMENTOS**

710

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

711

Ao laboratório Central Multiusuário de Pesquisas em Nanomateriais e Biosistemas da Universidade Federal do Maranhão;

712

713

Ao laboratório de Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte;

714

Ao Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco da Universidade Federal do Piauí.

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

## REFERÊNCIAS

- 726  
727  
728 [1] Silva, ABS et al. Morphology of the larynx of agouti (*Dasyprocta sp.*) Pesqui. Vet.  
729 Bras.2014; 34:593-598.
- 730 [2] Silva, CB et al. Anatomical and histological characteristics of teeth in agouti (*Dasyprocta*  
731 *prymnolopha* Wagler, 1831). Pesqui. Vet. Bras. 2013;33: 51-57.
- 732 [3] Menezes, DJA et al. Morfologia e dinâmica testicular em cutias - *Dasyprocta*  
733 *prymnolopha* ) adultas. Arq. Bras. Medic. Veter. Zootec.2017; 997-1005.
- 734 [4] LOPES, JB et al. Desempenho de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) criadas em cativeiro  
735 do nascimento até o desmame em Teresina, Piauí. Revta Bras. Zootec, , 2004;33, n. 6: 2318-  
736 2322
- 737 [5]DE ASSIS-NETO, AC et al. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese  
738 em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. Brazilian Journal of Veterinary Research  
739 and Animal Science, 2003; 40: 180-184.
- 740 [6] DE OLIVEIRA BEZERRA, D et al. Estudo morfológico do ceco de cutias (*Dasyprocta*  
741 *prymnolopha*) criadas em cativeiro. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, 2016; 38, n. 2:  
742 181-186.
- 743 [7]DE CARVALHO, Maria Acelina Martins et al. Topografia, morfologia externa e  
744 distribuição arterial do baço em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). Jornal Interdisciplinar de  
745 Biociências, , 2017; 2, n. 1,: 16-22.
- 746 [8]FERRAZ, MS. et al. Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de oócitos em cutias  
747 (*Dasyprocta prymnolopha*). Pesquisa Veterinária Brasileira, 2016;36, n. 3: 204-208,
- 748 [9] DE CARVALHO, Maria Acelina Martins et al. Structural plasticity and isolation of  
749 umbilical cord progenitor cells of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) raised in captivity.  
750 Semina: Ciências Agrárias, 2019; 40: 225-238
- 751 [10] DE CARVALHO, Maria Acelina Martins et al. Serum biochemistry in hystricomorpha:  
752 agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) during pregnancy. Bioscience Journal, 2017; 33:5,
- 753 [11] Björkman, N et al. Comparative placentation in laboratory animals: A review. Scand. J.  
754 Anim. Sci.1989; 16: 129-158.
- 755 [12] Kaiser, SK, Margarido, T C .C, Fischer, ML. Avaliação do comportamento de cutias  
756 *Dasyprocta azarae* e *Dasyprocta leporina* (Rodentia: Dasyproctidae) em cativeiro e  
757 semicativeiro em parques urbanos de Curitiba, Paraná, Brasil. Reva de Etologia,2011; 10: 68-  
758 82.

- 759 [13] AZU, OO. Testicular morphology in spontaneously hypertensive rat model: oxidant  
760 status and stereological implications. *Andrologia*, 2015; 47, n. 2, p. 123-137. LADD, F. V.
- 761 [14] Lobo et al. Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in  
762 superior cervical ganglia. In: *International review of cell and molecular biology*. Academic  
763 Press, 2014 : 123-155.
- 764 [15] Hawkins, E.D. Advanced microscopy and imaging techniques in immunology and cell  
765 biology. *Immunol Cell Biol.*2017; 95: 499-500.
- 766 [16] Piontek, MC, Roos, WH. Atomic Force Microscopy: An Introduction. *Methods Mol*  
767 *Biol.* 2018;1665: 243-258.
- 768 [17] Choi, S et al. Medical applications of atomic force microscopy and Raman spectroscopy.  
769 *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14:71-97.
- 770 [18] Gaikwad, RM. Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of  
771 moisturizer on their topology, rigidity, and friction. *Skin Res Technol.* 2010;16: 275-82.
- 772 [19] Chang, AC et al. Structure-dependent behaviours of skin layers studied by atomic force  
773 microscopy. *J Microsc.*2017; 267: 265-271.
- 774 [20] Vielmuth, F. et al. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the  
775 Pathogenesis of Pemphigus. *Front Immunol.*2018; 28: 9-485.
- 776 [21] Kotova, SL et al. Collagen structure deterioration in the skin of patients with pelvic  
777 organ prolapse determined by atomic force microscopy. *Microsc Microanal.*2015; 21: 324-33.
- 778 [22] Tang, W, Bhushan, B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin  
779 cream using atomic force microscope. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 76:1-15.
- 780 [23] Peñuela, L et al. Atomic force microscopy for biomechanical and structural analysis of  
781 human dermis: A complementary tool for medical diagnosis and therapy monitoring. *Exp*  
782 *Dermatol.*2018; 27: 150-155.
- 783 [24] Paydar, S et al. Structural Alteration in Dermal Vessels and Collagen Bundles following  
784 Exposure of Skin Wound to Zeolite–Bentonite Compound. *Journal of*  
785 *pharmaceutics*,2016;2016.
- 786 [25] Babaeijandaghi, F, Shabani, I, Seyedjafari, E, Naraghi, ZS, Vasei, M, Haddadi-Asl,  
787 VSM. Accelerated epidermal regeneration and improved dermal reconstruction achieved by  
788 polyethersulfone nanofibers. *Tissue Engineering Part A.* 2010. 16; 11: 3527-3536.
- 789 [26] Mahmoudzadeh Sagheb, H, Moudi, B. Basic Application of Stereology in Histology and  
790 Medical Sciences, *Gene Cell Tis.*2014; 1: e24237.
- 791 [27] Brown, D L. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J. Toxic.*  
792 *Pathot.*2017;30: 183-191.

- 793 [28] Martínez-Martínez, E et al. Stereological Quantification of Cell-Cycle Kinetics and  
794 Mobilization of Epithelial Stem Cells during Wound Healing. *Methods Mol Biol.*2016; 1453:  
795 93-107.
- 796 [29] Brown, DL. Practical Stereology Applications for the Pathologist. *Vet Pathol.*2017; 54;  
797 358-368.
- 798 [30] Amini, A et al. Stereological and molecular studies on the combined effects of  
799 photobiomodulation and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on  
800 wound healing in diabetic rats. *J Photochem Photobiol B.*2018; 182: 42-51.
- 801 [31] Kamp, S et al. Application of stereology to dermatological research. *Exp Dermatol.*  
802 2009, 18, 1001-9.
- 803 [32] Kamp, S et al. Stereological estimation of epidermal volumes and dermo-epidermal  
804 Surface Area in Normal Skin. *Dermatology*, 2011;223, 2:131-139.
- 805 [33] Martins, C et al. Quantification of mast cells and blood vessels in the skin of patients  
806 with cutaneous mucinosis. *Am J Dermatopathol.* 2010; 32: 453-8.
- 807 [34] Kamp, S et al. Hidradenitis suppurativa: a disease of the absent sebaceous gland?  
808 Sebaceous gland number and volume are significantly reduced in uninvolved hair follicles  
809 from patients with hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.*2011; 164: 1017-22.
- 810 [35] Ashkani Esfahani, S. et al. Topical Nicotinamide Improves Tissue Regeneration in  
811 Excisional Full-Thickness Skin Wounds: A Stereological and Pathological Study. *Trauma*  
812 *Mon.*2015; 20:18193.
- 813 [36] Ashkani-Esfahani, S. et al. Verapamil, a Calcium-Channel Blocker, Improves the Wound  
814 Healing Process in Rats with Excisional Full-Thickness Skin Wounds Based on Stereological  
815 Parameters. *Adv Skin Wound Care.*2016; 29: 271-4.
- 816 [37] Gundersen, HJ et al. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J*  
817 *Microsc* 1999;193: 199-211.
- 818 [38] Caputo, LFG, Gitirana, LB, Manso, PPA. Técnicas histológicas. Molinaro EM, Caputo  
819 LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios  
820 de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p. 89-188, 2010.
- 821 [39] Kawai, S, Takagi, Y, Kaneko, S, Kurosawa, T. Effect of three types of mixed anesthetic  
822 agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* 2011; 60: 481–487.
- 823 [40] Pruetz, SB. Stress and the immune system. *Pathophysiology*, 2003;9: 133-53.
- 824 [41] Campos, LS Tafuri, WL, Pinto, AJ. Avaliação de diferentes fixadores na preservação das  
825 características histológicas de pele de orelha de cães. *Arq. bras. med. vet. Zootec.* 2016;  
826 68:1212-1218.

- 827 [42] SOUZA, T M. et al. Histological aspects of canine and feline skin as a tool for  
828 dermatopathology. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,2009;29:177-190.
- 829 [43] Berkers, T et al. Topically Applied Ceramides Interact with the Stratum Corneum Lipid  
830 Matrix in Compromised Ex Vivo Skin. *Pharmaceutical research*.2018;35:48.
- 831 [44] Vela-Romera, A. et al. Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a  
832 comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis.  
833 *Histochemistry and cell biology*.2019; 151: 57-73.
- 834 [45] Sabbatini, S, Bassi, P, Bettini, G. Histopathological findings and proliferative activity of  
835 canine sebaceous gland tumours with a predominant reserve cell population. *Journal of*  
836 *comparative pathology*.2015; 152: 145-152.
- 837 [46] Isola, JGMP et al. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca  
838 (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. *Pesq. Vet. Brasileira*. 2013; 674-682.
- 839 [47] Ludovici, M et al. Influence of the sebaceous gland density on the stratum corneum  
840 lipidome. *Scientific reports*.2018;8:11500.
- 841 [48] Ali, AK et al. Histological changes of immediate skin expansion of the distal limb of  
842 rats. *Veterinary World*. 2018; 11:1706.
- 843 [49] Lozano, P. Encarnación. Estudio de los complejos adherentes cadherina E/Cateninas en  
844 queratinocitos epidérmicos murinos normales y transformados. Implicación de la  
845 plakoglobina en el fenotipo y orogenicidad. 1996.
- 846 [50] Hussain, H et al. Quantitative Analysis of Free Amino Acids and Urea Derived from  
847 Isolated Corneocytes of Healthy Young, Healthy Aged, and Diseased Skin. *Skin*  
848 *pharmacology and physiology*.2019;32:94-100.
- 849 [51] Andrião, NA. et al. Histologia, Histoquímica e Morfometria da Epiderme e Ductos  
850 Sudoríparos do Tegumento de Equinos. *Ars Veterinaria*,2019; 25:032-037.
- 851 [52] Molligan, J, Schon, L, Zhang, Z. A stereologic study of the plantar fat pad in young and  
852 aged rats. *Journal of anatomy*.2013; 223:537-545.
- 853 [53] Rodrigues, HWS et al. Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen  
854 Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal Stem  
855 Cells. *Acta Sci. Veterinariae*. 2018; 46:11.
- 856 [54] White, FH, Gohari, K. Desmosomes in hamster cheek pouch epithelium: their  
857 quantitative characterization during epithelial differentiation. *Journal of cell science*,1984; 66:  
858 411-429.

- 859 [55] Hung, CF et al. The risk of hydroquinone and sunscreen over-absorption via  
860 photodamaged skin is not greater in senescent skin as compared to young skin: Nude mouse  
861 as an animal model. *International journal of pharmaceutics*.2014;471:135-145.
- 862 [56] Badajoz, L et al. Descripción histológica del complejo folicular piloso en crías de  
863 alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2009; 20:154-164.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação representou grande desafio profissional e pessoal, decorrente da mudança de linha de pesquisa profissionalmente seguida e da necessidade de adaptação do estilo de pesquisa adotado pelo Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco, onde estive vinculado. No decorrer da dissertação muitas dificuldades foram vencidas desde a redução do número de animais disponíveis para execução do experimento a necessidades financeiras, nesse sentido obteve-se apoio incondicional dos pesquisadores Profs. Drs. Maria Acelina Martins de Carvalho, Napoleão Martins Argôlo Neto, Fernando Vagner Lobo Ladd (UFRN), Luciana Magalhaes Rebelo Alencar (UFMA) que disponibilizaram laboratório, equipamento e material de consumo necessário.

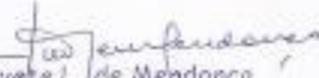
A metodologia executada durante a pesquisa era, até então, desconhecida pelo discente e contribuiu indubitavelmente na formação profissional uma vez que foi necessário conhecer técnicas estereológicas, topográficas tecidual e principalmente a aplicabilidade dessas técnicas. Ademais, os dados obtidos permitiram, tanto o treinamento científico do discente, quanto contribuíram para dar início a estudos morfométricos cutâneos tendo como modelo cutia.

## REFERÊNCIAS

- AMENÁBAR, J. M., MARTINS G. B., CHERUBINI, K., FIGUEIREDO M. A. Z. Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. **Journal of Oral Science**, 2006, v. 48, n. 3, p. 139-143.
- AMENÁBAR, J. M.; HUGO, F.N.; FOSSATI, A. M. C.; PADILHA, D. M. P The use of stereology as a method in histological research. **Rev Fac Odontol**. 2003, v 44, p 62-65.
- ANDERSEN, B.B., PAKKENBERG, B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **Br J Psychiatry**. 2003, v. 182, p. 354-361.
- AZULAY, M. M.; CUZZI, T.; PINHEIRO J. C. A.; AZULAY, D. R.; RANGEL, G. B. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia Cosmética. **An Bras Dermatol**. 2010; v. 85, n. 1, p.65-71.
- KAMP, S.; JEMEC, G. B. E.; KEMP, K.; KJELDSSEN C. R.; STENDERUP, K.; PAKKENBERGB.; DAM T. N. Application of stereology to dermatological research. **Experimental Dermatology**. 2009; v. 18 p. 1001–1009.
- BEDOYA, S. A. O, et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq Bras Med Vet e Zootec**.2016;68:147-154.
- KAMP, S. et al. Stereological Estimation of Epidermal Volumes and Dermo-Epidermal Surface Area in Normal Skin. **Dermatology**, v. 223, n. 2, p.131-139, 2011.
- PAIGE, M.; RAINEY, J.; GOH, M. A Study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy. **Micron** 32; 341-353(2001).
- VENTURONI, M.; GUTSMAN, T.; FANTNER, G.; KINDT, J.; HANSMA, P. investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy. *Biochemical and biophysical research communications*. v 303.p. 508-513;

**ANEXOS**

## ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

 <p style="text-align: center;"><b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b>  <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ</b>  <b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b>  <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p> <p style="text-align: center; font-size: small;">Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550          Telefone: (86) 3215-5734 _e-mail: coeapi@ufpi.edu.br</p>															
<h3 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h3> <p style="margin: 10px 0;">Certificamos que a proposta intitulada <i>"Estudo estereológico e ultra estrutural da pele saudável de cutias (<i>Dasyprocta prymnolopha</i>) adultas criadas em cativeiro"</i>, registrada nº 407/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. NAPOLEÃO MARTINS ARGOLO NETO do Departamento do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com células-tronco/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>Aprovado</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data <b>24/11/2017</b>.</p>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Finalidade</th> <th style="width: 70%;">( ) Ensino (X) Pesquisa Científica</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vigência da Autorização</td> <td>15/02/2018 à 30/12/2018</td> </tr> <tr> <td>Espécie/Linhagem/raça</td> <td>Cutias</td> </tr> <tr> <td>Nº de Animais</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Peso/ Idade</td> <td>1 a 3 anos/ 4,7 kg</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>05 Machos e 05 Fêmeas</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Núcleo de Estudo e Preservação de Animais Silvestres (NEPAS/UFPI). Número da Autorização do SISBIO: 60484-1</td> </tr> </tbody> </table>		Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica	Vigência da Autorização	15/02/2018 à 30/12/2018	Espécie/Linhagem/raça	Cutias	Nº de Animais	10	Peso/ Idade	1 a 3 anos/ 4,7 kg	Sexo	05 Machos e 05 Fêmeas	Origem	Núcleo de Estudo e Preservação de Animais Silvestres (NEPAS/UFPI). Número da Autorização do SISBIO: 60484-1
Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica														
Vigência da Autorização	15/02/2018 à 30/12/2018														
Espécie/Linhagem/raça	Cutias														
Nº de Animais	10														
Peso/ Idade	1 a 3 anos/ 4,7 kg														
Sexo	05 Machos e 05 Fêmeas														
Origem	Núcleo de Estudo e Preservação de Animais Silvestres (NEPAS/UFPI). Número da Autorização do SISBIO: 60484-1														
<p>Teresina, 24 de Novembro de 2017.</p> <div style="text-align: center;">   <b>Prof.ª Evete L. de Mendonça</b>              Coord. de Ética em Experimentação Animal UFPI              Coordenadora           </div>															

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO SISBIO - IBAMA PARA ATIVIDADE COM FINALIDADE CIENTÍFICA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60484-1	Data da Emissão: 30/10/2017 11:41	Data para Revalidação*: 29/11/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: HUANNA WALESKA SOARES RODRIGUES	CPF: 045.511.713-60
Título do Projeto: Análise estereológica: células-tronco e biomaterial regional na reparação cutânea em roedor silvestre	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ	CNPJ: 06.517.387/0001-34

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de tecido cutâneo	10/2017	08/2018

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO envolve o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	Esta autorização apenas terá validade com a apresentação do parecer favorável da CEUA da instituição da solicitante.
---	--

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Dayseanny de Oliveira Bezerra	COLABORADORA	037.799.293-33	5014335 SSP-PI	Brasileira
2	Yago Gabriel da Silva Barbosa	colaborador	048.130.473-86	2902054 SSP -PI-PI	Brasileira
3	Maria Azeilina Martins de Carvalho	COLABORADORA	128.470.114-04	117296 SSP-PI	Brasileira
4	Napolélio Martins Argôlo Neto	colaborador	945.990.505-63	075020699 SSP-BA	Brasileira
5	Lucilene dos Santos Silva	COLABORADORA	470.539.763-00	1258124 SSP-PI	Brasileira
6	Hermínio José da Rocha Neto	colaborador	008.833.713-83	2102730 esp-PI	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	TERESINA	PI	Núcleo de estudo e preservação de animais silvestres - NEPAS	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 52642816



Página 1/3