

Diana Heck

**EFEITO PARÁCRINO DE CÉLULAS DA PAPILA DÉRMICA  
NO REPARO CUTÂNEO: ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS,  
PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR E PROTEÇÃO AO  
FOTOENVELHECIMENTO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dra. Andrea Gonçalves Trentin

Coorientador: Prof. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreur

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Heck, Diana

Efeito parácrino de células da papila dérmica no reparo cutâneo: ativação de fibroblastos, produção de matriz extracelular e proteção ao fotoenvelhecimento / Diana Heck ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin, coorientadora, Derce de Oliveira Souza Recouvreux, 2018.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

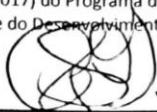
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células da papila dérmica. 3. Reparo cutâneo. 4. Vesículas extracelulares. 5. Fotoenvelhecimento. I. Trentin, Andréa Gonçalves. II. Recouvreux, Derce de Oliveira Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

**"Efeito parácrino de células da papila dérmica no reparo cutâneo: ativação de fibroblastos, produção de matriz extracelular e proteção ao fotoenvelhecimento"**

Por

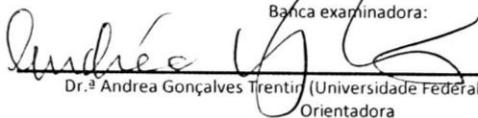
**Diana Heck**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (27/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

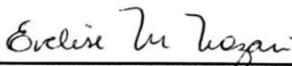


Prof. Dr. Geison de Souza Izídio  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr.ª Andrea Gonçalves Trentin (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientadora



Dr.ª Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Marimélia Aparecida Porcionatto (Universidade Federal de São Paulo)  
Por videoconferência

**Geison de Souza Izídio**  
Coordenador do PPG em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento  
UFSC

Florianópolis, 13 de março de 2018.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Andréa Gonçalves Trentin, uma grande inspiração profissional para mim, agradeço pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho, pelos ensinamentos e apoio.

À minha coorientadora, Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux, por todo incentivo e estímulo a seguir na pesquisa.

Ao professor Dr. Ricardo Castilho Garcez, por estar sempre disposto a ajudar a solucionar problemas metodológicos, para discutir resultados e dar bons conselhos científicos.

A todos professores da pós-graduação pela dedicação ao programa e pelos ensinamentos durante estes anos.

Ao médico Dr. Rogério Gomes, à enfermeira Silvana e toda equipe do Hospital e Maternidade Dr. Carlos Corrêa, por viabilizarem a coleta da pele humana, e a todos os pacientes que doaram um “pedacinho de si”.

A todos os profissionais da UFSC, ao pessoal da secretaria, da limpeza e da manutenção, que permitem o funcionamento da instituição. Em especial aos profissionais do LAMEB e LCME pela atenção e auxílio nos experimentos.

A todos os colegas do LACERT, pela ajuda nos experimentos, pelas ideias e conversas, sobre ciência ou sobre a vida. Pela agradável companhia diária que torna o trabalho mais leve. Tive a sorte de ganhar grandes amigos no LACERT, muitos não estão mais no laboratório, mas estarão para sempre na minha vida.

Aos meus queridos amigos que, de perto ou de longe, me acompanham e torcem por mim. Pessoas incríveis e únicas que, apenas com seu jeito de ser, me ensinam grandes lições e trazem sentido à minha vida.

À minha família, por compreender minha ausência, pelas orações e carinho. Em especial à minha avó Ivone, pelo exemplo de mulher e dedicação ao próximo.

À minha mãe e à minha irmã, minha base de sustentação, agradeço simplesmente por tudo! À minha mãe, pelo amor e educação, por me “jogar para o mundo” e por sempre me fazer acreditar que sou capaz. E à minha irmã, pelo apoio e amizade que se fortalece com o passar dos anos.

Ao meu pai, que mesmo tendo partido cedo, está sempre em meu coração e pensamento.

Ao Ricardo, meu amor, por me acolher num abraço nos momentos difíceis e por comemorar comigo cada resultado positivo. Sou muito feliz e grata por estar construindo uma vida ao teu lado!

Ao meu companheirinho canino, Tigre, pelo olhar confortante e por me ensinar o valor de uma pausa para um passeio e uma reflexão no final da tarde.

À CAPES, pela bolsa concedida e às agências financiadoras CNPq, INCT-Regenera e MCTIC.

E a todos que não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As células da papila dérmica (CPD) são consideradas como chave central do processo de sinalização que controla o complexo sistema de morfogênese e crescimento do folículo piloso. Contudo, a contribuição destas células, por meio de moléculas secretadas (efeito parácrino), no reparo cutâneo e proteção ao fotoenvelhecimento da pele adjacente não está completamente elucidada na literatura. Os fibroblastos dérmicos são elementos fundamentais para o restabelecimento da homeostase e reparo da pele, tendo atividade destacada na promoção do fechamento da lesão e na produção e remodelamento da matriz extracelular (MEC), funções também relacionadas com a fisiopatologia do fotoenvelhecimento. O presente trabalho investigou, em modelos murino e humano, os efeitos parácrinos das CPD no reparo cutâneo *in vitro*, avaliando a ativação de fibroblastos, produção de MEC e envolvimento de vesículas extracelulares (VE), além de proteção ao fotoenvelhecimento. Para isso, primeiramente, CPD foram isoladas pela técnica de explante a partir de papilas dérmicas dissecadas de folículos pilosos de camundongos e humanos. Após expansão, foi coletado o meio condicionado das células da papila dérmica murinas (MC-CPDm) e este foi avaliado em modelo de cultivo organotípico do folículo piloso, demonstrando que o MC-CPDm estimula o crescimento do pelo, mantendo a habilidade indutora sobre o folículo piloso. Em seguida, o MC-CPDm foi estudado frente a ativação de fibroblastos murinos (3T3), avaliando a proliferação, a migração e a conversão fibroblasto-miofibroblasto, através do ensaio de contração de colágeno e avaliação da expressão de  $\alpha$ -SMA. Os resultados obtidos demonstraram que o MC-CPDm estimula a proliferação e o fechamento da lesão *in vitro*, reduzindo a conversão fibroblasto-miofibroblasto. Visando a potencial aplicação biotecnológica e clínica para potencialização do processo de reparo cutâneo com maior qualidade de cicatrizes por meio da ativação do remodelamento dérmico, a ativação de fibroblastos e a produção de MEC foi avaliada em células humanas. Para isso, foi coletado o meio condicionado das células da papila dérmica humanas (MC-CPDh) e este foi avaliado quanto a proliferação e migração de fibroblastos dérmicos humanos, demonstrando que o MC-CPDh estimula a proliferação e migração celular. Em relação à produção de MEC, foi investigada a expressão proteica de colágeno I e fibronectina. Os resultados obtidos demonstraram que o MC-CPDh promoveu aumento na produção de fibronectina, entretanto não foi observada diferença significativa sobre a síntese de colágeno I. Uma vez que VE vêm sendo apontadas como

importantes mediadores de efeitos parácrinos em diversos sistemas, a participação destas na interação com fibroblastos também foi investigada. As VE presentes no MC-CPDh (VE-CPDh) foram isoladas por ultracentrifugação e a interação vesícula-célula foi analisada através da observação da incorporação de VE-CPDh coradas com corante fluorescente por fibroblastos dérmicos, além da investigação da atividade biológica medida em termos de proliferação celular. Os resultados mostraram que VE-CPDh estão presentes no MC-CPDh e são incorporadas por fibroblastos dérmicos humanos. Além disso, demonstram que ambos, VE-CPDh e fatores solúveis presentes no sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh, atuam na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos. Para avaliação da proteção ao fotoenvelhecimento, foi estabelecido modelo *in vitro* para o fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos por exposição à radiação UVB. Os fibroblastos expostos à radiação UVB apresentaram os indicadores de fotoenvelhecimento, aumento na atividade de  $\beta$ -galactosidase e expressão de p21, associado à morfologia característica de células senescentes e redução na produção de MEC (colágeno I e fibronectina). Em seguida, o efeito do MC-CPDh foi avaliado sobre a viabilidade celular e morte por apoptose em fibroblastos fotoenvelhecidos. Os resultados indicaram que o MC-CPDh estimulou a sobrevivência destas células, exercendo efeito protetor contra a morte celular por apoptose, induzida pela exposição à radiação UVB. Quanto à produção de MEC, o MC-CPDh foi capaz de recuperar parcialmente expressão de fibronectina diminuída após fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos, porém não foi observado efeito sobre a produção de colágeno I. Em conjunto, os resultados sugerem que as CPD exercem efeito parácrino sobre fibroblastos dérmicos durante o processo de reparo cutâneo, promovendo os eventos celulares que levam ao fechamento efetivo da lesão, além de fornecer proteção contra o fotoenvelhecimento, favorecendo a sobrevivência de fibroblastos fotoenvelhecidos. Em adição, VE-CPDh estão envolvidas nos efeitos observados e apontam para a relevância de sua exploração como uma promissora ferramenta terapêutica para o reparo cutâneo.

**Palavras-chave:** reparo cutâneo, células da papilla dérmica, vesículas extracelulares, fotoenvelhecimento

## ABSTRACT

Dermal papilla cells (DPC) are known as key signaling center that controls the complex system of morphogenesis and hair growth. However, the paracrine contribution of these cells to skin repair and photoaging protection remains elusive. Dermal fibroblasts are essential elements to skin homeostasis and repair, with highlighted activity in wound closure and extracellular matrix (ECM) production and remodeling. These functions are also related to the physiopathology of photoaging. The present work aimed to investigate *in vitro* the paracrine effects of DPC in skin repair, evaluating fibroblast activation, ECM production and the involvement of extracellular vesicles (EV), as well as photoaging protection. Firstly, DPC were isolated by dermal papilla explant from mice and humans hair follicles. After expansion, the murine dermal papilla cells conditioned medium (mDPC-CM) was collected and evaluated in hair follicle organotypic culture, demonstrating that it stimulates hair growth, maintaining the hair inductive ability. Then, the effect of mDPC-CM was evaluated concerning murine fibroblasts (3T3) activation - proliferation, migration and fibroblast-myofibroblast conversion, through the collagen contraction assay and  $\alpha$ -SMA expression. Results showed that mDPC-CM stimulates the proliferation and wound closure *in vitro* and reduces fibroblast-myofibroblast conversion. Aiming for a biotechnological and clinical application to promote the skin repair with higher quality scars through the activation of dermal remodeling, fibroblast activation and ECM production were evaluated in human cells. For this, the human dermal papilla cells conditioned medium (hDPC-CM) was collected and the proliferation and migration of human dermal fibroblasts was evaluated. Data showed that hDPC-CM stimulates cell proliferation and migration. Regarding the ECM production, the protein expression of collagen I and fibronectin was investigated. The results showed that hDPC-CM promoted an increase in fibronectin production, with no difference in type I collagen. Since EV have been identified as important mediators in several systems, its participation in fibroblasts activation was also investigated. EV present in hDPC-CM (hDPC-EV) were isolated by ultracentrifugation and vesicle-cell interaction analyzed by incorporation of fluorescent stained-hDPC-EV by dermal fibroblasts. In addition, its biological activity was measured by cell proliferation. Results showed that hDPC-EV are present in hDPC-CM and are incorporated by human dermal fibroblasts. In addition, both hDPC-EV and soluble factors present in the hDPC-CM supernatant, stimulate the

proliferation of human dermal fibroblasts. To evaluate photoaging protection, an *in vitro* photoaging model was established by exposure of dermal fibroblasts to UVB radiation. UVB-exposed-fibroblasts showed the photoaging indicators - increased  $\beta$ -galactosidase activity and p21 expression, associated with senescent morphology and ECM (collagen I and fibronectin) reduced production. Then, the effect of hDPC-CM was assessed in cell viability and death by apoptosis in photoaged fibroblasts. Results indicated that hDPC-CM stimulated cell survival with protective effect against UVB-induced cell death by apoptosis. Regarding ECM production, hDPC-CM was able to partially recover the decreased fibronectin expression by photoaged fibroblasts, with no effect in collagen I production. Taken together, results suggest that DPC exerts paracrine effects in dermal fibroblasts during cutaneous repair, promoting cellular events that lead to wound closure, besides providing protection against photoaging, favoring the survival of photoaged fibroblasts. In addition, hDPC-EV are involved in the observed effects and point to the relevance of their exploration as a promising therapeutic tool for cutaneous repair.

**Keywords:** skin healing, dermal papillae cells, extracellular vesicles, photoaging

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Morfogênese, ciclo e estrutura do folículo piloso.....	28
<b>Figura 2</b> Fases do reparo de lesões cutâneas. ....	31
<b>Figura 3</b> Biogênese das VE. ....	35
<b>Figura 4</b> Esquema representativo das culturas realizadas com folículos pilosos de camundongos.....	41
<b>Figura 5</b> Isolamento de fibroblastos dérmicos humanos .....	44
<b>Figura 6</b> Cultivo primário das CPDm .....	57
<b>Figura 7</b> Expansão das CPDm em meio base ou com suplementação de FGF2 .....	58
<b>Figura 8</b> Cultivo da região do bulge sobre colágeno I.....	60
<b>Figura 9</b> Padronização do cultivo organotípico.....	61
<b>Figura 10</b> Efeito do MC-CPDm sobre o crescimento do pelo.....	62
<b>Figura 11</b> Efeito do MC-CPDm na proliferação de fibroblastos 3T3 ..	63
<b>Figura 12</b> Efeito do MC-CPDm na migração de fibroblastos 3T3 e fechamento de lesão <i>in vitro</i> .....	65
<b>Figura 13</b> Efeito do MC-CPDm sobre a contração de colágeno por fibroblastos .....	66
<b>Figura 14</b> Efeito do MC-CPDm sobre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos .....	67
<b>Figura 15</b> Cultivo das CPDh .....	68
<b>Figura 16</b> Efeito do MC-CPDh na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos .....	70
<b>Figura 17</b> Efeito do MC-CPDh na migração de fibroblastos dérmicos humanos e fechamento da lesão <i>in vitro</i> .....	71
<b>Figura 18</b> Efeito do MC-CPDh sobre a produção de MEC por fibroblastos dérmicos humanos .....	72
<b>Figura 19</b> Incorporação de VE-CPDh por fibroblastos dérmicos humanos .....	73
<b>Figura 20</b> Proliferação de fibroblastos dérmicos humanos por VE-CPDh e sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh .....	74
<b>Figura 21</b> Viabilidade de fibroblastos dérmicos humanos após a exposição à radiação UVB .....	76
<b>Figura 22</b> Indicadores de fotoenvelhecimento por fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVB.....	77
<b>Figura 23</b> Efeito do MC-CPDh sobre a viabilidade de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos .....	78
<b>Figura 24</b> Efeito protetor do MC-CPDh sobre a morte por apoptose de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos .....	80

<b>Figura 25</b> Efeito do MC-CPDh sobre a produção de MEC por fibroblastos fotoenvelhecidos .....	82
<b>Figura 26</b> Esquema representativo dos efeitos parácrinos das CPD sobre o reparo cutâneo, demonstrados neste trabalho.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Condições testadas para o isolamento das células epidermais do folículo piloso.....	46
<b>Tabela 2</b> Anticorpos primários e secundários utilizados para <i>western blot</i> .....	52
<b>Tabela 3</b> Tempo de exposição dos fibroblastos dérmicos à radiação UVB na intensidade de 34 $\mu$ W/cm <sup>2</sup> e suas respectivas doses.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Linhagem de fibroblastos embrionários provenientes do Instituto Nacional de Saúde (NIH - <i>Nacional Institute of Health</i> )
$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de músculo liso
ANOVA	Análise de variância
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
BSA	Albumina sérica bovina
CDK	Quinases dependentes de ciclina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPD	Células da papila dérmica
CPDh	Células da papilla dérmica humanas
CPDm	Células da papila dérmica murinas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfoxido
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblsto-2
K-SFM	Meio de queratinócitos livre de soro
LACERT	Laboratório de células-tronco e regeneração tecidual
MC-CPDh	Meio condicionado das células da papila dérmica humanas
MC-CPDm	Meio condicionado das células da papila dérmica murinas
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]
PBS	Tampão fosfato salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Rb	Retinoblastoma
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
T3	Triiodo-L-tironina
TBS	Tampão tris salina
TBS-T	Tampão tris salina com tween

TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
VE	Vesículas extracelulares
VE-CPDh	Vesículas extracelulares presentes no meio condicionado das células da papila dérmica humanas

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>25</b>
3.1	ESTRUTURA DA PELE .....	25
3.2	FOLÍCULO PILOSO .....	26
3.3	CÉLULAS DA PAPILA DÉRMICA.....	28
3.4	LESÕES CUTÂNEAS E CICATRIZAÇÃO.....	30
3.5	MATRIZ EXTRACELULAR E REMODELAMENTO .....	32
3.6	MEIO CONDICIONADO E VESÍCULAS EXTRACELULARES NO REPARO TECIDUAL .....	33
3.7	FOTOENVELHECIMENTO DA PELE – RELAÇÃO COM FIBROBLASTOS E O REPARO CUTÂNEO .....	36
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1	CULTIVOS CELULARES .....	41
<b>4.1.1</b>	<b>Isolamento das CPD de folículos pilosos murinos e humanos.</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Formação de esferas pelas CPD</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Isolamento e cultivo de fibroblastos dérmicos humanos</b> .	<b>43</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Cultivo de fibroblastos murinos 3T3</b> .....	<b>44</b>
4.2	OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DAS CÉLULAS DA PAPILA DÉRMICA.....	45
4.3	CULTIVO DO FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGOS.. .....	46
<b>4.3.1</b>	<b>Cultivo de células epidermais do folículo piloso</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Cultivo organotípico do folículo piloso</b> .....	<b>47</b>
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	48
4.5	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	48
4.6	ENSAIO DE MIGRAÇÃO OU WOUND HEALING <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	49

4.7	ENSAIO DE CONTRAÇÃO DO COLÁGENO .....	50
4.8	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA .....	50
4.9	WESTERN BLOT .....	51
4.10	MODELO DE FOTOENVELHECIMENTO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS COM RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B .....	53
4.11	ANÁLISE DE INDICADORES DE FOTOENVELHECIMENTO.....	54
4.12	SEPARAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES A PARTIR DO MC-CPDH .....	54
<b>4.12.1</b>	<b>Ensaio de incorporação de VE-CPDh por fibroblastos dérmicos humanos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.12.2</b>	<b>Avaliação do efeito das VE-CPDh sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos .....</b>	<b>56</b>
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
5.1	ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CPDm.....	57
5.2	ANÁLISE DO MC-CPDm SOBRE O FOLÍCULO PILOSO.....	58
<b>5.2.1</b>	<b>Cultivo das células epidermais do folículo piloso.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Cultivo organotípico do folículo piloso .....</b>	<b>60</b>
5.3	MC-CPDm INDUZ A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS .....	62
5.4	MC-CPDm ESTIMULA A MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS E FECHAMENTO DE LESÃO IN VITRO .....	64
5.5	EFEITO DO MC-CPDm NA CONVERSÃO FIBROBLASTO-MIOFIBROBLASTO E CONTRAÇÃO DO COLÁGENO.....	65
5.6	ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CPDh.....	68
5.7	O MC-CPDh ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS .....	69
5.8	O MC-CPDh PROMOVE O FECHAMENTO DA LESÃO <i>IN VITRO</i> POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS .....	70

5.9	O MC-CPD <sub>h</sub> AFETA A PRODUÇÃO DE MEC POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.....	71
5.10	VE-CPD <sub>h</sub> SÃO INCORPORADAS POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS .....	72
5.11	A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS É ESTIMULADA TANTO PELAS VE-CPD <sub>h</sub> QUANTO POR FATORES SOLÚVEIS.....	73
5.12	ESTABELECIMENTO DO MODELO DE FOTOENVELHECIMENTO COM RADIAÇÃO UVB .....	75
5.13	FIBROBLASTOS EXPOSTOS À RADIAÇÃO UVB APRESENTAM INDICADORES DE FOTOENVELHECIMENTO ..	76
5.14	O MC-CPD <sub>h</sub> PROMOVE AUMENTO NO NÚMERO DE FIBROBLASTOS FOTOENVELHECIDOS.....	78
5.15	O MC-CPD <sub>h</sub> APRESENTA EFEITO PROTETOR SOBRE A MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS FOTOENVELHECIDOS .....	79
5.16	O MC-CPD <sub>h</sub> AFETA A PRODUÇÃO DE MEC POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS FOTOENVELHECIDOS .....	80
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
6.1	FGF2 FAVORECE O ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CPD DE VIBRISSA DE CAMUNDONGOS.....	83
6.2	O MC-CPD <sub>m</sub> ESTIMULA O CRESCIMENTO DO PELO EM MODELO ORGANOTÍPICO.....	84
6.3	O MC-CPD <sub>m</sub> ESTIMULA A ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS .....	86
6.4	CPD <sub>m</sub> PODEM SER EXPANDIDAS IN VITRO MANTENDO CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ESFERAS .....	88
6.5	O MC-CPD <sub>h</sub> ESTIMULA A ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS E PRODUÇÃO DE FIBRONECTINA .....	89
6.6	VE-CPD <sub>h</sub> SÃO INCORPORADAS POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS E ESTIMULAM SUA PROLIFERAÇÃO.	91
6.7	MC-CPD <sub>h</sub> EXERCE EFEITO PROTETOR SOBRE A MORTE CELULAR E PROMOVE A PRODUÇÃO DE	

FIBRONECTINA POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS	
FOTOENVELHECIDOS.....	93
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os folículos pilosos se desenvolvem por um complexo processo morfogênico resultante de uma série altamente coordenada de interações epitélio-mesenquimais. A papila dérmica é considerada a chave central da sinalização deste processo, além de ser apontada como responsável por manter o crescimento do pelo e controlar o complexo sistema do ciclo piloso (ALONSO; FUCHS, 2006). A presença de folículos pilosos na pele tem sido relacionada com um melhor processo de reparo, uma vez que, animais com maior densidade de pelos fecham a lesão mais rapidamente e com menor formação de cicatrizes (HIGGINS *et al.*, 2017). Em humanos, também se observa melhora no processo de reparo em regiões com pelos quando comparado a regiões sem pelos (JAHODA; REYNOLDS, 2001). Já é bem descrito que, após uma lesão, nova epiderme se forma com forte contribuição de células epidermais provenientes dos anexos cutâneos (PLIKUS *et al.*, 2012). Acredita-se que a papila e a bainha dérmica, componentes dérmicos do folículo piloso, contribuam de forma semelhante no reparo da derme. As células da papila dérmica (CPD) apresentam propriedades de células-tronco, como plasticidade celular e habilidade de produzir derme funcional, incluindo os anexos, quando combinadas com componentes epidermais (LEIRÓS *et al.*, 2014).

Além dos componentes celulares, a matriz extracelular (MEC) tem papel ativo no reparo tecidual, sendo importante para o fechamento da lesão, bem como na interação direta com as células que atuam neste complexo processo. A produção insuficiente de MEC está relacionada com a formação de feridas crônicas. Em contrapartida o excesso de MEC leva à formação de fibroses e cicatrizes hipertróficas (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). Desta forma, a produção de MEC e posterior remodelamento estão diretamente relacionados com a qualidade da cicatriz formada (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). A grande maioria das proteínas que compõem a MEC é produzida por fibroblastos e miofibroblastos presentes na lesão (XUE; JACKSON, 2015). Assim, a atividade destas células se torna alvo de estratégias que buscam um reparo cutâneo mais rápido e uma melhora estética e funcional das cicatrizes formadas.

Estudos em terapia celular que buscam o reparo cutâneo, têm enfatizado o efeito parácrino de células aplicadas, relacionando os efeitos atingidos à fatores secretados pelas células e não ao seu efeito direto (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; LI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2013). Recentemente, o efeito parácrino de células-tronco mesenquimais

frente a diversas injúrias, incluindo o reparo cutâneo, foi conferido a vesículas extracelulares (VE) secretadas por estas células (PHINNEY; PITTENGER, 2017). As VE, que correspondem a microvesículas e exossomos, carregam diversas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que, protegidos pela membrana, chegam ativos e influenciam o comportamento de células alvo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Várias pesquisas sobre a fisiopatologia do fotoenvelhecimento têm encontrado correlações com certos aspectos da cicatrização de feridas, especialmente relacionados à composição da MEC (EMING *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2007). Além disso, o processo de reparo cutâneo é comprometido com o envelhecimento dos indivíduos, que apresentam alterações em eventos cruciais do reparo como recrutamento de células, deposição de MEC e resposta inflamatória (EMING *et al.*, 2014). Assim como no contexto de lesão cutânea, no fotoenvelhecimento os fibroblastos são as células responsáveis por esta atividade sobre a MEC.

Tendo em vista o potencial regenerativo das CPD e suas habilidades indutivas por meio de secreção de moléculas sinalizadoras, o presente trabalho teve como hipótese que os efeitos parácrinos das CPD se estendem além do ciclo de crescimento do pelo, exercendo efeitos sobre a ativação de fibroblastos dérmicos e potencializando o reparo cutâneo. Desta forma, os efeitos parácrinos das CPD foram estudados enfatizando a atividade de fibroblastos e sua atuação na produção de MEC, bem como o envolvimento de vesículas extracelulares nestes efeitos. Em adição, este trabalho buscou estabelecer um modelo *in vitro* para o fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos por exposição à radiação ultravioleta B (UVB) e avaliar, sobre os fibroblastos fotoenvelhecidos, a proteção ao fotoenvelhecimento e resposta ao reparo cutâneo.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar, em modelos murino e humano, os efeitos parácrinos das CPD no reparo cutâneo *in vitro*, avaliando ativação de fibroblastos, produção de matriz extracelular, envolvimento de vesículas extracelulares e proteção ao fotoenvelhecimento.

### Objetivos específicos

1. Isolar e expandir CPD do folículo piloso murino e humano, bem como fibroblastos dérmicos humanos.
2. Estabelecer modelo de cultivo do folículo piloso para análise das células epidermais e crescimento de pelos.
3. Obter o meio condicionado das CPD de camundongos e de humanos e testar o seu efeito sobre o crescimento de pelos.
4. Avaliar os efeitos biológicos do meio condicionado das células da papila dérmica na ativação de fibroblastos murinos e humanos, analisando:
  - a. Viabilidade, proliferação, morte e migração celular
  - b. Conversão para miofibroblastos pela expressão do marcador alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e pela capacidade de contração de colágeno.
5. Avaliar os efeitos do meio condicionado das células da papila dérmica humana na produção de MEC (fibronectina, colágeno I e colágeno III) por fibroblastos dérmicos humanos.
6. Estabelecer o isolamento de vesículas extracelulares (exossomos) a partir do meio condicionado das CPD humana e testá-las quanto a incorporação por fibroblastos dérmicos humanos e sobre a proliferação destas células.
7. Estabelecer método de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos humanos pela exposição à radiação UVB.
8. Avaliar os efeitos do meio condicionado das CPD sobre fibroblastos fotoenvelhecidos, avaliando a proteção ao fotoenvelhecimento e resposta ao reparo cutâneo.



### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 ESTRUTURA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano atuando como interface com o ambiente externo e na manutenção da homeostase do organismo. Além da função de barreira protetora contra raios solares, traumas mecânicos, perda de fluídos e invasão por micro-organismos, a pele possui ainda funções termorreguladora e sensorial. Estruturalmente, é composta de duas camadas separadas por uma membrana basal: externamente a epiderme, que forma a barreira protetora; e internamente a derme, que fornece suporte e nutrição à epiderme (FORNI; TROMBETTA-LIMA; SOGAYAR, 2012; FUCHS, 2007).

A epiderme consiste em um epitélio de múltiplas camadas estratificadas composto pela epiderme interfolicular associada aos seus anexos: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas. As principais células que compõem a epiderme são os queratinócitos, que se organizam em camadas de acordo com seu estágio de diferenciação. Além dos queratinócitos, a epiderme é constituída por melanócitos (células pigmentares), células de Langerhans (envolvidas com o sistema imune) e Merkel (mecanorreceptores). A derme, por sua vez, possui menor quantidade de células quando comparada à epiderme, sendo constituída principalmente por MEC composta essencialmente por colágeno, glicosaminoglicanos e elastina. Ela é altamente vascularizada por uma rede de capilares, denominado plexo dérmico, que garante nutrição à pele. Ainda estão presentes nesta região, vasos linfáticos, terminações nervosas e os anexos derivados da epiderme. O componente celular mais abundante na derme são os fibroblastos, que migram através do tecido e são responsáveis pela síntese, degradação e remodelamento de diversas proteínas da MEC. Além dos fibroblastos, células do sistema imune como monócitos, macrófagos e dendrócitos, também estão presentes na derme (BLANPAIN; FUCHS, 2009; KRETZSCHMAR; WATT, 2014).

A interação entre a derme e a epiderme está envolvida no desenvolvimento e manutenção destas camadas e seus componentes. Esta interação já é bem descrita e mostra papel essencial na morfogênese e crescimento do folículo piloso (YANG; COTSARELIS, 2011).

### 3.2 FOLÍCULO PILOSO

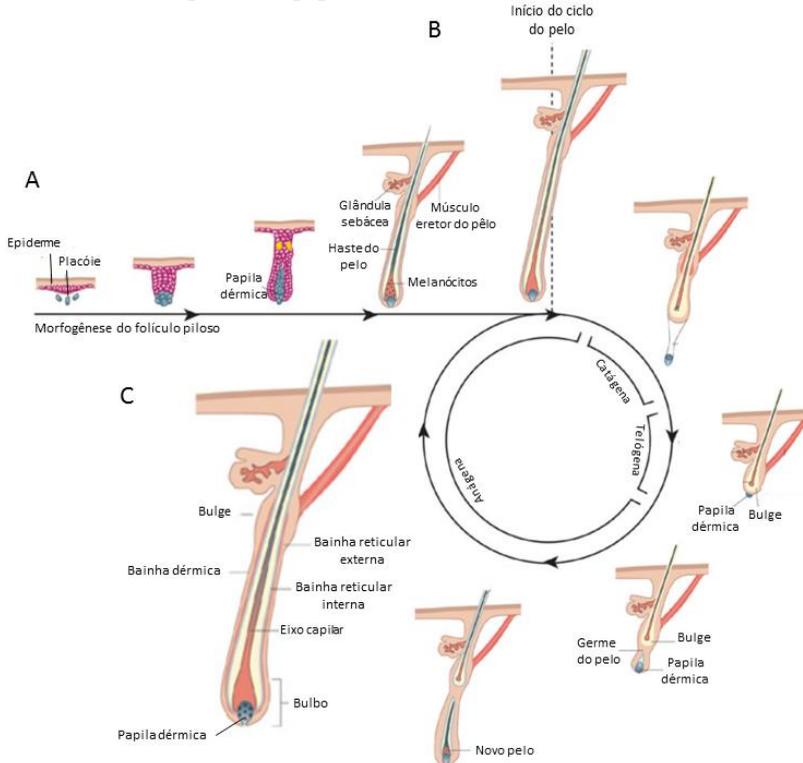
Durante a embriogênese, a pele inicia seu desenvolvimento como uma camada única de células epidermais. Em seguida, células mesenquimais formam a derme subjacente, onde células especializadas organizam-se em pequenos agregados (placóides) (ALONSO; FUCHS, 2006). Os folículos pilosos desenvolvem-se por um complexo processo morfogênico resultante de uma série altamente coordenada de interações epitélio-mesenquimais (Figura 1A). Inicialmente, as células do placóide estimulam as células-tonco epidermais sobrejacentes a proliferar e formar invaginações na derme. As células epidermais proliferam e alcançam os agregados dermais, envolvendo-os. Após completa morfogênese, as células epidermais irão formar a matriz epitelial e os placóides constituirão a papila dérmica (BALAÑÁ; CHARREAU; LEIRÓS, 2015; FUCHS, 2007). Além das estruturas formadas pela ectoderme e pela mesoderme, o folículo piloso também é composto por precursores de melanócitos derivados da crista neural (SIEBERBLUM *et al.*, 2004).

Quando maduros, os folículos pilosos formam estruturas complexas, altamente regenerativas, com regiões enriquecidas em células-tronco que garantem sua renovação. Os pelos maduros são formados por círculos concêntricos que compõem duas estruturas principais: a bainha radicular externa, que está em contato direto com a membrana basal da epiderme, e a bainha radicular interna, que forma um canal onde se encontra o eixo capilar (Figura 1C). O eixo capilar, o pelo propriamente dito, é formado por um conjunto de queratinócitos diferenciados (tricócitos), mortos e compactados, organizados em camadas. A bainha radicular interna também é composta por camadas de células, porém estas são formadas por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. A bainha radicular externa, por sua vez, é composta por células que formam uma camada contínua à epiderme interfolicular. Na bainha radicular externa, existe uma região protuberante denominada bulge, que constitui um relevante reservatório de células-tronco (FUCHS, 2007; PLIKUS *et al.*, 2012).

Os folículos pilosos passam por ciclos de crescimento (fase anágena), de regressão (fase catágena) e por um período de repouso (fase telógena) (Figura 1B). Durante a fase anágena, as células da base do folículo (bulbo folicular), consideradas células de amplificação, rapidamente proliferam e diferenciam produzindo a fibra do cabelo e suas diferentes camadas. Quando esta atividade mitótica da região do bulbo diminui e eventualmente cessa, o folículo piloso entra na fase

catágena que é caracterizada pelo apoptose das células epiteliais da região inferior do folículo. Após este período, entra na fase latente conhecida como telógena, até que ocorra a renovação de uma subsequente fase anágena (FUCHS, 2007). A iniciação do ciclo depende da ativação de células-tronco quiescentes da região do bulge que são estimuladas a proliferar e diferenciar em resposta a sinais enviados pela papila dérmica (MAHJOUR; GHAFARPASAND; WANG 2012; ZHANG, *et al.*, 2013). A comunicação cruzada entre os compartimentos epidermal e dermal é considerada essencial para a regeneração do folículo piloso durante o ciclo do pelo, sendo geralmente as células dérmicas ditas como indutoras e as epidérmicas responsivas neste processo (YANG; COTSARELIS, 2011).

**Figura 1 Morfogênese, ciclo e estrutura do folículo piloso.** (A) Células mesenquimais da derme formam o placóide que dará origem à papila dérmica. A papila dérmica sinaliza às células epidermais que invaginam e originam as estruturas epidermais do folículo piloso. (B) Quando maduros os folículos pilosos se regeneram de forma cíclica entre fases de crescimento (anágena), regressão (catágena) e repouso (telógena). (C) Estrutura de um folículo piloso maduro. Destaque para os componentes ativos epidermais – bulge, bainha reticular externa e bainha reticular interna- e mesenquimais – papila dérmica e bainha dérmica.



Fonte Adaptado de Fuchs (2007)

### 3.3 CÉLULAS DA PAPIA DÉRMICA

A papila dérmica corresponde a um agregado de células mesenquimais localizado na base do folículo piloso (bulbo) que atrai interesse por sua atuação na regulação do desenvolvimento e

crescimento do pelo, e também por ser considerado um reservatório de células-tronco multipotentes (DRISKELL *et al.*, 2014). Além da papila dérmica, é encontrado no folículo piloso um segundo componente mesenquimal, a bainha dérmica. Esta camada é composta principalmente por colágeno e fibroblastos especializados e encontra-se alinhada à camada epidermal do folículo piloso, da região do bulge até o bulbo. As células presentes na bainha dérmica apresentam características similares às das células da papila dérmica (CPD), sendo a bainha dérmica um reservatório de CPD durante o ciclo do folículo piloso (YANG; COTSARELIS, 2011).

As CPD secretam biomoléculas que suportam a proliferação e diferenciação das células epiteliais na regeneração do folículo piloso durante o ciclo do pelo, bem como na sua formação na pele embrionária. Esta propriedade indutiva das CPD sobre o ciclo do pelo foi demonstrada em estudos onde papilas dérmicas intactas e CPD previamente cultivadas foram implantadas sob a pele sem pelos resultando na formação de novos folículos pilosos (JAHODA; HORNE; OLIVER, 1984; OLIVER, 1970). Mais recentemente, Rompolas e colaboradores (2012) demonstraram que a ablação da papila dérmica compromete a regeneração do pelo, ressaltando a necessidade desta estrutura de origem mesenquimal para o crescimento do pelo. Esta propriedade foi reiterada em estudos de bioengenharia, nos quais diferentes fontes de células epidermais e mesenquimais isoladas da pele foram combinadas em biomateriais e apenas as combinações contendo CPD foram capazes de formar estruturas semelhantes a folículos pilosos (CHERMNYKH *et al.*, 2010; LEIRÓS *et al.*, 2014).

Surpreendentemente, o potencial terapêutico das CPD se estende além da indução do crescimento do pelo e formação de novos folículos pilosos. Quando isoladas do folículo piloso e expandidas em cultura, as CPD exibem multipotência e plasticidade, podendo se diferenciar em distintas linhagens mesenquimais como adipócitos e osteócitos, além de células com morfologia neural (RICHARDSON *et al.*, 2005). Em estudos *in vivo* visando o reparo cutâneo, a aplicação de CPD em substitutos dérmicos resultou na melhora da cicatrização, com menor formação de fibroses e retração do tecido cicatricial, além de formação de folículos pilosos (HIGGINS, *et al.*, 2017; LEIRÓS *et al.*, 2014).

Em todos estes estudos, pode-se inferir que a maior contribuição das CPD ocorre por meio das moléculas secretadas, demonstrando atividade parácrina sobre células vizinhas. Fato reforçado por ensaios *in vitro* utilizando o meio condicionado das CPD, ou seja, o sobrenadante de cultivo contendo os fatores secretados por estas células. Fujie e

colaboradores (2001) demonstraram o efeito parácrino das CPD sobre a proliferação e quimiotaxia das células epidermais da bainha radicular externa, etapa importante para o alongamento do pelo na fase anágena. Em abordagem semelhante, foi verificado que os fatores derivados das CPD promovem a sobrevivência, proliferação e tubulogênese de células endoteliais, aumentando a vasculogênese e conseqüentemente o aporte de nutrientes ao folículo piloso (BASSINO *et al.*, 2015).

Apesar dos grandes avanços nos estudos que buscam elucidar o mecanismo de sinalização envolvido neste complexo sistema de regulação do ciclo do pelo, pouco se sabe sobre a contribuição das CPD fora do ambiente do folículo piloso.

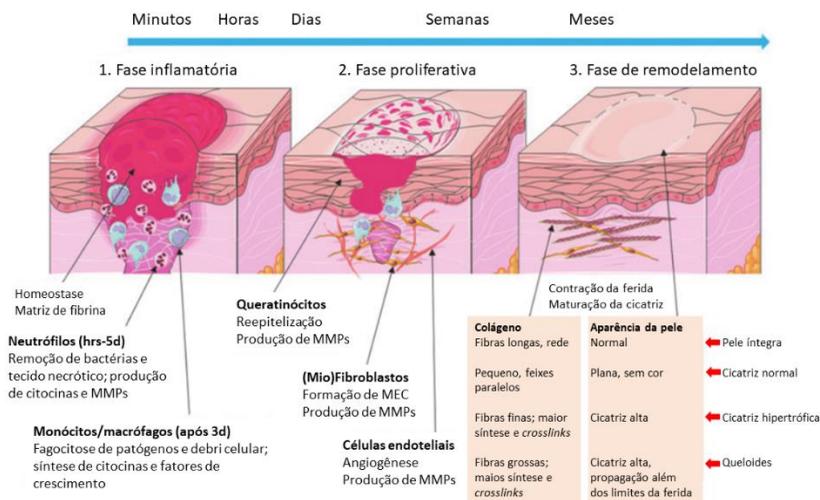
### 3.4 LESÕES CUTÂNEAS E CICATRIZAÇÃO

Após uma lesão na pele, instantaneamente se inicia uma série de eventos dinâmicos, visando reestabelecer a homeostase do tecido. No geral, há dois mecanismos que promovem o fechamento de uma lesão: a regeneração e o reparo. Enquanto a regeneração representa uma resposta em que o novo tecido recapitula perfeitamente a arquitetura tecidual, mantendo suas propriedades mecânicas e funcionais, o processo de reparo resulta no fechamento da lesão sem reconstituir as características essenciais do tecido (REINKE; SORG, 2012).

Em humanos, este processo de fechamento da lesão se dá por um mecanismo de reparo, que leva a formação de cicatrizes. As cicatrizes consistem em um aglomerado de MEC desorganizada que, apesar de fechar a lesão, não reconstituem as características essenciais do tecido. No caso da pele, as cicatrizes geralmente apresentam ausência de elasticidade, folículos pilosos, glândulas, terminações nervosas e de pigmentação (REINKE; SORG, 2012). O reparo cutâneo pode ser dividido em três fases que se sobrepõem: fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de remodelamento da MEC (Figura 2).

Imediatamente após a lesão, se inicia a fase inflamatória envolvendo a cascata de coagulação e respostas do sistema imune. O processo de homeostase se inicia e o sangramento é controlado por um agregado de plaquetas formado no local da lesão que, posteriormente, gera uma matriz de fibrina. Esta matriz de fibrina estanca o sangramento e fornece ancoragem inicial para infiltração e adesão celular. A ativação da cascata de coagulação libera fatores de crescimento e citocinas que estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, seguida de macrófagos, para o debridamento inicial da área lesada (GURTNER *et al.*, 2008)

**Figura 2 Fases do reparo de lesões cutâneas** 1. Fase inflamatória: busca estancar o sangramento e recuperar a homeostase do tecido com a formação de uma matriz de fibrina, células do sistema imune são atraídas para a lesão e fazem o debridamento e secreção de citocinas e fatores de crescimento. 2. Fase proliferativa: queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais migram para a área lesionada, novos vasos são formados e inicia-se a formação do tecido de granulação. 3. Fase de remodelamento: ocorre o depósito desorganizado de MEC e posterior remodelamento, contração da superfície da lesão e completa reepitelização, geralmente sem a formação dos anexos epidérmicos. Abaixo da figura, caixas comparam como as fibras de colágeno encontram-se dispostas e a aparência da pele, na pele íntegra, cicatriz normal, cicatriz hipertrófica e queloides.



Fonte: adaptado de Xue e Jackson (2015).

Após 2 a 3 dias, o processo inflamatório progride para a fase proliferativa. Nesta fase ocorre a reepitelização, a formação do tecido de granulação e angiogênese. (GURTNER *et al.*, 2008). Primeiramente os queratinócitos das bordas da lesão migram sobre o tampão de fibrina, juntamente com as células-tronco dos folículos pilosos e glândulas sebáceas próximas, que auxiliam na reepitelização (PLIKUS *et al.*, 2012). Fibroblastos, atraídos das bordas da lesão, são estimulados a proliferar e a se diferenciar em miofibroblastos, células contráteis que atuam unindo as bordas da lesão. Tanto os fibroblastos quanto os miofibroblastos produzem proteínas de MEC que compõem o tecido de granulação. O tecido de granulação permite o crescimento de novos

capilares sanguíneos que fornecem nutrição e oxigênio para o tecido em formação (GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012).

Uma vez fechada a lesão, a cicatriz imatura formada pode ser remodelada. A MEC, que durante a fase proliferativa é disposta de forma desorganizada, é agora realinhada e a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos entram em apoptose. Essa fase de remodelamento pode durar anos dependendo da severidade da lesão, que gradualmente recupera sua integridade (XUE; JACKSON, 2015).

### 3.5 MATRIZ EXTRACELULAR E REMODELAMENTO

Para compreensão da complexidade do processo de remodelamento é imprescindível definir a estrutura da MEC da derme íntegra que este processo busca reconstruir. A MEC é uma rede dinâmica e organizada de diversas macromoléculas e enzimas proteolíticas secretadas por células do tecido. A MEC da derme consiste de proteínas estruturais fibrilares que formam uma rede tridimensional, e proteínas não fibrilares, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que criam um ambiente carregado, dinâmico e osmoticamente ativo. A proteína fibrilar mais abundante é o colágeno, que compreende cerca de 75% do peso seco da derme. Esta matriz colágena é composta predominantemente por colágeno dos tipos I e III, numa razão de 5:1, além dos menos prevalentes tipos V, IV, VII e XVII. Outras proteínas estruturais da MEC, como fibronectina e elastina, estão relacionadas à adesão e migração das células da pele e elasticidade tecidual. As moléculas da MEC interagem entre si e com as células que as produzem constituindo um componente tecidual ativo e complexo capaz de influenciar a sobrevivência, proliferação e função celular (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016; XUE; JACKSON, 2015).

Na ferida cicatrizante, a densidade e a forma como as fibras de colágeno encontram-se dispostas determinam a característica deste tecido, sendo o tecido cicatricial limitado a aproximadamente 80% da resistência à tração da pele normal e resulta em um ponto fraco suscetível a novos ferimentos (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). No tecido cicatricial, as fibras de colágeno encontram-se alinhadas paralelamente à pele, ao contrário da formação em rede da derme íntegra. Durante o estágio inicial da formação do tecido de granulação, a expressão de colágeno III tem um maior aumento em comparação à expressão de colágeno I, resultando no aumento da razão dos dois tipos de colágeno. Neste estágio, a proporção de colágeno III que na pele

íntegra é de 20% passa a ser em torno de 50%, em relação ao colágeno I. Durante a maturação da cicatriz, a razão diminui para níveis próximos aos normais. Este remodelamento ocorre através da atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores (TIMP). As MMPs catalisam a hidrólise da maioria das moléculas da MEC, incluindo colágeno, elastina, laminina e fibronectina. A expressão de MMP na pele íntegra é baixa, entretanto, durante o processo de reparo, uma série de MMP são produzidas. Dentre diversos tipos de MMP, são produzidas especialmente MMP-1, MMP-8 e MMP-13, as quais estão envolvidas na degradação do colágeno (XUE; JACKSON, 2015). O remodelamento da MEC requer uma regulação coordenada de MMP e seus inibidores, sendo que cicatrizes fibróticas estão relacionadas com a baixa atividade de MMP e alta atividade de TIMP (LI *et al.*, 2015).

Os fibroblastos/miofibroblastos produzem grande parte dos componentes da MEC, enquanto estas mesmas moléculas, simultaneamente, atuam modificando a função destas células. Neste sentido, a interação dos fibroblastos com a MEC pode ser considerada como uma forma de regulação autócrina crucial para o processo de reparo cutâneo. Como no caso de muitos aspectos da cicatrização de feridas, deve ser atingido um equilíbrio entre a atividade inadequada dos fibroblastos, que pode levar a uma ferida crônica, e uma atividade exacerbada, que pode levar a formação de cicatrizes fibróticas. (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016).

### 3.6 MEIO CONDICIONADO E VESÍCULAS EXTRACELULARES NO REPARO TECIDUAL

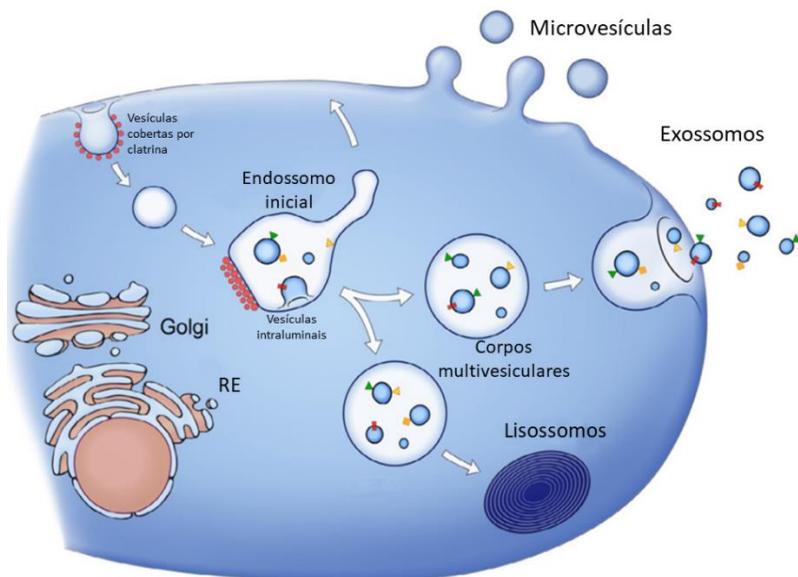
Os mecanismos de reparo tecidual têm como objetivo recuperar a homeostase do tecido, para isso são ativadas vias de sinalização complexas, em níveis intra e intercelulares (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014; RAJENDRAN *et al.*, 2017). Em organismos multicelulares, a comunicação entre as células é mediada por contato célula-célula, por moléculas solúveis ou ainda, por VE que carregam uma seleção de moléculas ativas (TKACH; THÉRY, 2016).

Na pele, diversas citocinas e fatores de crescimento são responsáveis pela formação da resposta inflamatória e no controle da proliferação, diferenciação e metabolismo das células envolvidas no processo de reparo, mostrando uma forte contribuição da comunicação celular para o sucesso do reparo tecidual (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). A relevância desta sinalização parácrina, é destacada em estudos que utilizam o meio condicionado

(contendo o secretoma) de diversas fontes de células (KIM, W. *et al.*, 2007; LI, M. *et al.*, 2015; ZHAO, J. *et al.*, 2013). O meio condicionado de células-tronco mesenquimais, amplamente estudado nestas abordagens, contém moléculas capazes de mediar eventos importantes para o reparo, como a proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos, promoção da angiogênese, produção de MEC e modulação da inflamação (KONALA *et al.*, 2016; TAMAMA; KERPEDJIEVA, 2012).

Além de fatores solúveis presentes no meio condicionado, recentemente, o papel de VE na comunicação celular em pequenas e grandes distâncias tem sido destacado e relacionado a diversas patologias (HU *et al.*, 2016; PHINNEY; PITTENGER, 2017; RAJENDRAN *et al.*, 2017). As células podem secretar diferentes tipos de VE que são classificadas de acordo com sua forma de liberação e tamanho (Figura 3). Em geral, são classificadas como microvesículas ou exossomos, porém existe certa controvérsia na nomenclatura e tamanho conferido aos diferentes tipos de VE (COLOMBO; RAPOSO, Graça; THÉRY, 2014; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As microvesículas, também chamadas de ectossomos, são formadas e liberadas por brotamento da membrana plasmática da célula, apresentando tamanho variado (100 – 1000 nm de diâmetro). Por outro lado, os exossomos, são gerados no interior de endossomos multivesiculares ou corpos multivesiculares e são secretados quando estes compartimentos fusionam com a membrana plasmática. Os exossomos são menores que 100 nm e são enriquecidos com componentes derivados de endossomos (ABELS; BREAKFIELD, 2016; KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). O conteúdo das VE varia de acordo com a forma de biogênese, tipo celular e condições fisiológicas. Em geral, são carregadas com variadas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, incluindo mRNA, microRNA, que, protegidos pela membrana, chegam ativos à célula alvo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As VE carregam moléculas de superfície que permitem que estas sejam reconhecidas por células alvo. Uma vez ligadas à célula alvo, as VE podem induzir sinalização via interação receptor-ligante ou podem ser internalizadas por endocitose ou fusão de membranas para entregar seu conteúdo no citoplasma, modificando então o estado fisiológico da célula receptora (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TKACH; THÉRY, 2016).

**Figura 3 Biogênese das VE.** As microvesículas se formam diretamente a partir de brotamento da membrana plasmática. Enquanto os exossomos são originados a partir de vesículas endocíticas que se formam por invaginação da membrana plasmática ou vesículas intraluminais por brotamento em endossomos iniciais. Os endossomos iniciais darão origem aos corpos multivesiculares que, quando fundem com a membrana plasmática, liberam os exossomos no ambiente extracelular, permitindo que atuem em processos de sinalização intercelular.



Fonte: adaptado de Raposo e colaboradores (2013)

Com relação à pele, um dos estudos pioneiros na área demonstrou a produção de exossomos por queratinócitos humanos, os quais estimulam de produção de MMP-1 por fibroblastos dérmicos (CHAVEZ-MUNOZ *et al.*, 2008), evidenciando o seu forte papel na comunicação derme-epiderme. Estudos seguintes demonstraram que exossomos derivados de células epiteliais aceleram o reparo cutâneo com inibição de formação de cicatrizes, também relacionando com o aumento de expressão de MMP-1 por fibroblastos (ZHAO *et al.*, 2017). Estudos envolvendo exossomos derivados de células-tronco mesenquimais obtiveram resultados semelhantes ao meio condicionado das mesmas, apresentando efeitos sobre a proliferação e a ativação de fibroblastos (HU *et al.*, 2016) e promovendo a síntese de colágeno e angiogênese (ZHANG *et al.*, 2015). Em conjunto, estes estudos

demonstram que as VE recapitulam em grande parte os efeitos terapêuticos atribuídos às suas células de origem (PHINNEY; PITTENGER, 2017).

Um dos grandes desafios na aplicação terapêutica de VE está relacionado com a padronização dos métodos de isolamento e a caracterização destas vesículas, não apenas relacionando seu tamanho e/ou origem celular, mas principalmente seu conteúdo (KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014; TKACH; THÉRY, 2016). Uma vez que as células apresentam perfil de secreção diferente, variações na condição de cultivo para coleta das VE pode resultar em falta de homogeneidade nos resultados (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Entretanto, utilização de VE evita a transferência de células que podem conter mutações ou danos no DNA (PHINNEY; PITTENGER, 2017), além de apresentar menor imunogenicidade quando comparado a alguns tipos celulares (KONALA *et al.*, 2016). Superando as dificuldades metodológicas e com o aprofundamento do conhecimento das suas propriedades, a aplicação clínica das VE se mostra como uma promissora terapia para o reparo cutâneo.

### 3.7 FOTOENVELHECIMENTO DA PELE – RELAÇÃO COM FIBROBLASTOS E O REPARO CUTÂNEO

O envelhecimento da pele é um fenômeno biológico complexo influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos. O processo de envelhecimento intrínseco ou cronológico é uma consequência inevitável de alterações genéticas e fisiológicas que ocorrem não apenas na pele, mas em todos os tecidos do organismo com o passar do tempo (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017). Por outro lado, o envelhecimento extrínseco está relacionado com a exposição cumulativa a diversos estímulos externos, como radiação ultravioleta (UV), poluição, dieta e outros componentes do estilo de vida individual, os quais induzem alterações celulares que levam ao envelhecimento prematuro da pele (SILVEIRA; PEDROSO, 2014). Como a pele atua como uma interface entre o organismo e o meio ambiente, é intensamente atingida por fatores externos, dos quais destaca-se a radiação UV por exposição acumulada e desprotegida ao sol (HUH *et al.*, 2015; TOBIN, 2017).

A radiação UV é classificada de acordo com seu comprimento de onda em UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) e UVC (200–280 nm). Apenas a radiação UVA e parte da UVB são capazes de ultrapassar a camada de ozônio e atingir a superfície terrestre, representando,

respectivamente, 95% e 2-5% da radiação UV que atinge a pele (HUH *et al.*, 2015; TOBIN, 2017). A radiação UVC, extremamente danosa aos organismos, é completamente absorvida pela camada de ozônio e atmosfera (TOBIN, 2017).

Ao atingir a pele, a radiação UVB é majoritariamente absorvida pela epiderme, atingindo as células epidermais, todavia, 10-30% desta radiação pode penetrar a derme papilar causando danos também em fibroblastos e na MEC dérmica. Já a radiação UVA penetra mais profundamente, afetando ambas as camadas, epiderme e derme (ZENG *et al.*, 2014).

Uma vez que a quantidade de energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, a radiação UVB é mais energética que a UVA (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017). Estas características se relacionam com a forma de interação com as células e o tipo de dano causado. Enquanto o fotoenvelhecimento mediado por radiação UVA está associado ao estresse oxidativo (SHIM *et al.*, 2013), os efeitos da radiação UVB estão predominantemente atribuídos a danos no DNA (SILVEIRA; PEDROSO, 2014), apesar da formação de espécies reativas de oxigênio também ser atribuída à radiação UVB (CHAINIAUX *et al.*, 2002; ZENG, *et al.*, 2014). Além das diferentes propriedades físicas, as respostas celulares induzidas pela radiação UVA e UVB são sobrepostas e ambas contribuem para características específicas do fotoenvelhecimento (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017; GILCHREST, 2013).

A exposição constante à radiação UV provoca alterações fisiológicas prejudiciais à pele, incluindo inflamação epidermal, hiperpigmentação, imunossupressão, carcinogênese e fotoenvelhecimento (HUH *et al.*, 2015). A pele fotoenvelhecida é caracterizada por alterações no tecido conjuntivo dérmico, conferindo aspecto flácido e coriáceo (BUECHNER *et al.*, 2008). Histologicamente, estas alterações se devem principalmente à redução na síntese de colágeno I e III e aumento da expressão de MMP-1, resultando na degradação da matriz colágena existente (ZENG *et al.*, 2017), além do acúmulo de fibras de elastina parcialmente degradadas na derme papilar, conhecida como elastose (GILCHREST, 2013; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011). Por serem as principais células responsáveis pelo contínuo remodelamento da MEC da derme, os fibroblastos são os principais alvos de estudos da fisiopatologia do fotoenvelhecimento, bem como, na pesquisa de alternativas terapêuticas que buscam fotoproteção ou reversão dos danos causados pelo

fotoenvelhecimento (MAO *et al.*, 2015; SHIM *et al.*, 2013; ZENG, *et al.*, 2014).

Os fibroblastos da pele fotoenvelhecida se encontram comumente em estado de senescência, ativado tanto por excesso de espécies reativas de oxigênio quanto por danos no DNA (GILCHREST, 2013). Fibroblastos senescentes são caracterizados por morfologia achatada e atividade de  $\beta$ -galactosidase aumentada, tanto *in vivo* como *in vitro* (BRUN *et al.*, 2016), além de apresentarem um fenótipo secretório associado a senescência (SASP – do inglês *senescence associated secretory phenotype*), com secreção de citocinas, quimiocinas, proteínas e fatores de crescimento específicos (BRUN *et al.*, 2016; SIKORA *et al.*, 2011).

A senescência celular é regulada por uma variedade de mecanismos, com particular contribuição das vias p53/p21<sup>WAF1</sup> e p16<sup>INK4a</sup>/Rb. Em resumo, p53 é ativada em resposta ao dano no DNA e orquestra a ativação transcricional de uma variedade de genes que contribuem para a inibição do crescimento, como o inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDK) p21<sup>WAF1</sup>. Em uma via paralela, a regulação aumentada do inibidor de CDK p16<sup>INK4a</sup> leva à inibição da fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), impondo uma parada prolongada no ciclo celular. As duas vias representam cenários alternativos para a iniciação da senescência e existem evidências de que a ativação paralela de ambas as vias conduz à senescência compulsória (MAO *et al.*, 2015). Estudos demonstram que a exposição repetida a doses moderadas de radiação UVB estimula vias de sinalização que culminam na ativação das vias de supressão de crescimento p53/p21<sup>WAF1</sup> e/ou p16<sup>INK4a</sup>/Rb, e esta ativação é capaz de determinar o início do processo de senescência (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

O envelhecimento da pele, seja cronológico ou por fatores extrínsecos, causa diminuição gradual na capacidade de manutenção de sua homeostase e propriedades regenerativas. A elasticidade e a resistência da pele envelhecida estão significativamente reduzidas e com isso, a capacidade de reparo tecidual diminui gradualmente (SHIM *et al.*, 2013). Em feridas crônicas em idosos, fibroblastos residentes proliferam menos e são menos responsivos a sinais envolvidos no processo de reparo, indicando estado de senescência celular. Estas feridas também apresentam retardo na infiltração de células inflamatórias, angiogênese e reepitelização (GOULD *et al.*, 2016). A redução na integridade tecidual da pele envelhecida, caracterizada pela expressão diminuída de colágeno combinada ao aumento da sua

degradação por MMP, também compromete o reparo cutâneo (KIM, *et al.*, 2007). Esses achados reiteram a relação entre o fotoenvelhecimento e o reparo cutâneo, sendo a atividade dos fibroblastos e sua relação com a MEC efetores biológicos comuns a ambos os processos.

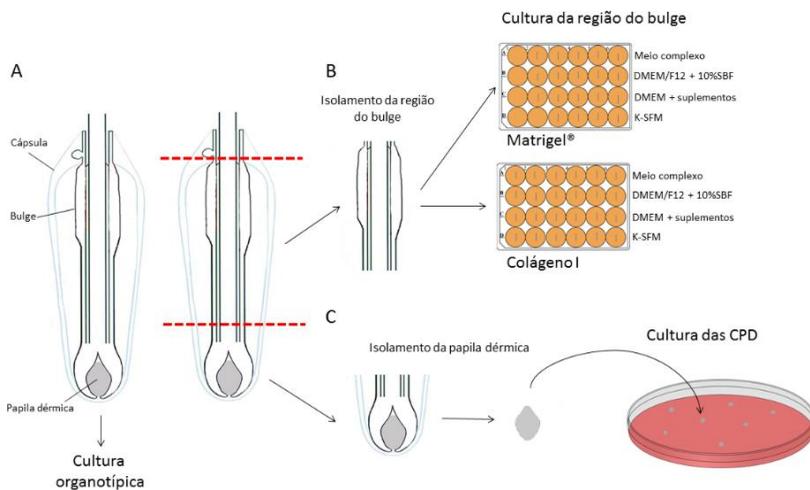


## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTIVOS CELULARES

O presente trabalho foi desenvolvido com células de camundongos e de humanos. As células de camundongos foram isoladas das vibrissas de animais da linhagem C57Bl/6 disponibilizados pelo biotério de Biologia Celular/BEG. Os animais com idade de 6 a 8 semanas foram sacrificados por deslocamento cervical e a região da pele contendo as vibrissas coletada e armazenada em tampão fosfato salina (PBS) para posterior isolamento dos folículos pilosos. A partir dos folículos pilosos isolados foram realizadas a cultura das células da papila dérmica murina (CPDm), a cultura da região do bulge e a cultura organotípica do folículo piloso, explicadas a seguir e representadas na figura 4. Foram utilizados também fibroblastos embrionários murinos da linhagem 3T3 (3T3-NIH, provenientes do *Nacional Institute of Health*), mantidos criopreservados e descongelados conforme necessidade.

**Figura 4 Esquema representativo das culturas realizadas com folículos pilosos de camundongos.** (A) Cultura organotípica do folículo piloso íntegro para análise do crescimento do pelo. (B) Cultura da região do bulge em diferentes substratos e meios de cultivo, para o isolamento das células-tronco epidermais do folículo piloso. (C) Cultura das CPD, para expansão das células e coleta do meio condicionado.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

As células humanas foram obtidas de fragmentos de pele da região temporal de pacientes (sexo feminino, idades entre 48 e 60 anos) submetidos à cirurgia de *lifting facial* (ritidoplastia), mediante apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). O fragmento de pele foi coletado e armazenado a 4°C em recipiente estéril, contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Gibco) acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina - PS) (1U/μg, Gibco) e encaminhado para o LACERT, para realização dos procedimentos de cultivo celular.

Os procedimentos com camundongos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Protocolo PP00810) (Anexo 2). A coleta das amostras de pele humana está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tendo recebido o certificado de aprovação (CAAE:37167014.9.0000.5355) do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) (Anexo 3).

#### **4.1.1 Isolamento das CPD de folículos pilosos murinos e humanos**

Para o isolamento e cultivo das CPD, os folículos pilosos de camundongos e de humanos foram extraídos e dissecados sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ61) com a ajuda de pinças e agulhas entomológicas.

Os folículos pilosos de camundongo foram retirados pela face interna do tecido da região contendo as vibrissas. Após afrouxar o tecido adjacente, o folículo piloso foi pinçando na parte mais próxima à epiderme e arrancado juntamente com a cápsula de colágeno que o envolve. Após, foi realizado um corte transversal na parte inferior onde se encontra a papila dérmica, sendo a parte superior reservada para posterior isolamento das células do bulge. Para isolar a papila dérmica da região inferior, a cápsula colágena foi cuidadosamente afastada com o auxílio de agulhas finas e a papila dérmica transferida com auxílio de uma pipeta para uma placa de cultivo contendo DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell) ou DMEM suplementado com 20% de SBF acrescido de 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblsto-2 (FGF2, Sigma).

Os folículos pilosos humanos foram retirados também pela face interna do fragmento de pele, porém, como não possuem a cápsula, a parte do bulbo contendo a papila foi cortada diretamente do tecido.

Posteriormente, o tecido adjacente foi removido e a papila dérmica cuidadosamente isolada e transferida para placas de cultivo contendo DMEM suplementado com 20% de SBF e 10 ng/mL FGF2. Para facilitar a adesão das papilas dérmicas à placa, estas foram delicadamente pressionadas contra o plástico com o auxílio de uma agulha fina.

As culturas primárias das células da papila dérmica murina e humana (CPDm e CPDh, respectivamente) foram mantidas durante 5 dias em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade para permitir a adesão e migração das células. Após este período, o meio de cultivo foi substituído por DMEM suplementado com 10% SBF contendo ou não FGF2, e este foi trocado a cada 3 ou 4 dias. A partir da migração das CPD formaram-se colônias e, quando observada a fusão destas colônias, as células foram retiradas da placa utilizando tripsina/EDTA 0,05% (Invitrogen), centrifugadas e transferidas para garrafas de cultivo para expansão.

#### **4.1.2 Formação de esferas pelas CPD**

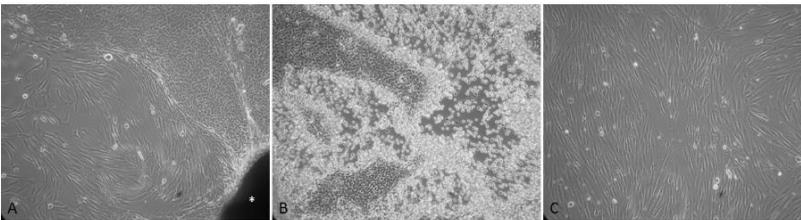
Para avaliação da propriedade de formação esferas, característica das CPD, foi realizado o ensaio de formação de esferas pela técnica de gota pendente, conforme descrito por Topouzi e colaboradores (2017). Resumidamente, as CPDh em passagem 3 foram descoladas da placa com tripsina, centrifugadas e ressuspensas em DMEM suplementado com 10% SBF na concentração de 500 células/μl. Em seguida, gotas de 10 μl da suspensão contendo 5x10<sup>3</sup> células foram distribuídas pela tampa da placa de Petri. A tampa foi invertida cuidadosamente e colocada sobre a base placa, na qual foi adicionado PBS para formar uma câmara úmida e evitar o ressecamento da gota. As esferas foram visualizadas em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus IX71) e fotografadas após 48 horas de cultivo.

#### **4.1.3 Isolamento e cultivo de fibroblastos dérmicos humanos**

Para o isolamento dos fibroblastos dérmicos, os fragmentos de pele foram cortados em pedaços de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> e incubados com 12,5 U/mL de dispase II (Gibco) *overnight*, a 4°C. Após este período, a epiderme e a hipoderme foram removidas, restando apenas a derme, que foi picada em pedaços bem pequenos. Estes fragmentos foram colocados em placas de cultivo contendo DMEM suplementado com 20% de SBF e mantidos em condições de cultivo para permitir a

migração de fibroblastos para a placa de cultivo. Após observação de células aderidas à placa, o meio de cultivo foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SBF e trocado a cada 3 dias. Apesar da retirada mecânica da epiderme, além dos fibroblastos, a presença de colônias de queratinócitos também foi observada, como pode ser visualizado na figura 5A. No momento em que as colônias mistas ocupavam toda a superfície da placa de cultivo, as células foram incubadas com tripsina/EDTA 0,05% e colocadas na estufa a 37°C por 5 minutos. Queratinócitos aderem mais fortemente à placa, dessa forma, após este período na estufa, apenas os fibroblastos se encontravam em suspensão (Figura 5B). A tripsina contendo os fibroblastos foi recolhida da placa e sua atividade bloqueada com DMEM suplementado com 10% de SBF. A suspensão foi centrifugada e o precipitado contendo os fibroblastos ressuspenso em DMEM suplementado com 10% de SBF e as células foram então transferidas para outra placa. Com esta primeira repicagem, os fibroblastos foram isolados sem contaminação com queratinócitos (Figura 5C). Ao atingir confluência de 90%, os fibroblastos foram novamente tripsinizados e plaqueados em menor densidade para expansão ou criopreservados em SBF com 5% de DMSO (Sigma) para posterior utilização. Para os experimentos foram utilizados fibroblastos isolados de três doadores.

**Figura 5 Isolamento de fibroblastos dérmicos humanos.** (A) Cultura primária: monocamada mista de fibroblastos e queratinócitos a partir do explante dérmico (\*) (B). Após a adição de tripsina 0,05% por 5 minutos, os fibroblastos se encontravam em suspensão e os queratinócitos aderidos. (C) Cultura secundária: apenas fibroblastos isolados. Escala: 200µm



#### 4.1.4 Cultivo de fibroblastos murinos 3T3

Para os experimentos de avaliação do meio condicionado das CPDm de camundongos, foram utilizados fibroblastos embrionários murinos da linhagem 3T3. Estes foram mantidos criopreservados em

nitrogênio líquido e descongelados conforme a necessidade. Para isso, foi adicionado meio de cultivo (DMEM + 10% de SBF) aquecido a 37°C sobre as células ainda congeladas. Logo após o descongelamento, as células foram centrifugadas para retirada do meio de criopreservação, ressuspensas e plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de SBF. Após 5 dias de aclimatação, as células foram novamente descoladas da placa com tripsina/EDTA 0,05% e plaqueadas nas condições de cada experimento.

#### 4.2 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DAS CÉLULAS DA PÁPILA DÉRMICA

Para coleta do meio condicionado das CPDm (MC-CPDm), CPDm em segunda passagem foram cultivadas em placas de 150 cm<sup>2</sup> até atingirem a confluência de 90%. Após, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e mantidas em condições de cultivo em DMEM sem SBF (15 ml) por 48 horas. O MC-CPDm foi então coletado e centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos, filtrado em membrana com poros de 0,22 µm e concentrado 5 vezes com filtro Amicon Ultra-15 Ultracel 3K (Millipore). Foi coletado o MC-CPDm de cultivos de CPDm provenientes de três camundongos e as amostras concentradas foram armazenadas em -80°C para posterior utilização. Para o tratamento foi utilizado o MC-CPDm nas concentrações de 10 e 20% em DMEM sem SBF.

O meio condicionado das CPDh (MC-CPDh) foi coletado de células em terceira passagem e após o ensaio de formação de esferas (descrito em 4.1.2). Desta forma, as CPDh foram expandidas até terceira passagem, repicadas e cultivadas em gota pendente na concentração de 5x10<sup>3</sup> células/gota em placas de 150 cm<sup>2</sup>. Após 48 horas as esferas foram coletadas, homogeneizadas em meio de cultivo, devolvidas para a placa e cultivadas até atingirem a confluência de 90%. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS e adicionado 15ml de DMEM sem SBF por 48 horas. O MC-CPDh foi então coletado, centrifugado e filtrado conforme descrito acima para o MC-CPDm. O MC-CPDh foi coletado a partir de células de três doadores e, a fim de equalizar as amostras, as células produtoras foram contabilizadas e o volume de meio foi ajustado de acordo com o número de células produtoras. Ou seja, o MC-CPDh foi concentrado com filtro Amicon Ultra-15 Ultracel 3K até obter uma concentração contendo o meio produzido por 5x10<sup>5</sup> células em um volume final de 1mL. Para os experimentos, foi utilizado

um *pool* de MC-CPDh dos três doadores ajustados na mesma concentração.

### 4.3 CULTIVO DO FOLÍCULO PILOSO DE CAMUNDONGOS

Já é estabelecido que a papila dérmica exerce papel importante na indução da formação do folículo piloso e na modulação do crescimento do pelo, principalmente por meio de secreção de moléculas sinalizadoras. Desta forma, visando investigar a presença de moléculas indutoras do ciclo do pelo, foram testadas duas abordagens de cultivo de folículo piloso murino.

#### 4.3.1 Cultivo de células epidermais do folículo piloso

Para o cultivo das células epidermais presentes na região do bulge do folículo piloso, vibrissas de camundongos foram extraídas conforme descrito nos itens 3.1 e 3.1.1. Os folículos pilosos reservados após o isolamento da papila dérmica foram dissecados para remoção da cápsula que o envolve, deixando exposta a região do bulge. Após a dissecação, os bulges isolados foram colocados individualmente em placas de 24 poços com diferentes substratos e meios de cultivo, descritos na tabela 1.

**Tabela 1 Condições testadas para o isolamento das células epidermais do folículo piloso**

Substrato	Meio de cultivo
Colágeno I	Meio complexo: $\alpha$ -MEM contendo 15% de SBF, 2% de extrato de embrião de galinha, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona (Sigma), 10 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina (Sigma), 1 $\text{ng/mL}$ de insulina (Sigma), 0,4 $\text{ng/mL}$ de 3-3'-5 triiodo-L-tironina (T3, Sigma), 0,01 $\text{ng/mL}$ de glucagon (Sigma), 0,1 $\text{ng/mL}$ de fator de crescimento epidermal (EGF, Sigma) e 1 $\text{ng/mL}$ de FGF2
	DMEM/F12 suplementado com 10% SBF
	DMEM/F12 + suplementos: 10% de SBF, 10 $\text{ng/ml}$ de EGF, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona e 5 $\text{ug/ml}$ de insulina
	Meio para progenitores epidermais: K-SFM suplementado com 0,1 $\text{ng/mL}$ de EGF e 30 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de pituitária bovina

Matrigel ®	Meio complexo: $\alpha$ -MEM contendo 15% de SBF, 2% de extrato de embrião de galinha, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona, 10 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina, 1 $\text{ng/mL}$ de insulina, 0,4 $\text{ng/mL}$ de T3, 0,01 $\text{ng/mL}$ de glucagon, 0,1 $\text{ng/mL}$ EGF e 1 $\text{ng/mL}$ de FGF2
	DMEM/F12 suplementado com 10% SBF
	DMEM/F12 + suplementos: 10% de SBF, 10 $\text{ng/ml}$ de EGF, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona e 5 $\text{ug/ml}$ de insulina
	Meio para progenitores epidermais: K-SFM suplementado com 0,1 $\text{ng/mL}$ de EGF e 30 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de pituitária bovina

Primeiramente, placas de cultivo de 24 poços foram revestidas com os substratos Colágeno I (BD) e Matrigel® (BD), conforme indicação dos fabricantes. Para o revestimento com colágeno I, as placas foram incubadas com 5  $\mu\text{g/cm}^2$  durante uma hora em temperatura ambiente. Após este período, o excesso de solução foi retirado, os poços lavados com PBS e esterilizados por exposição à luz ultravioleta durante 30 minutos. Para o revestimento com Matrigel®, este foi diluído a 10% em DMEM gelado. Foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de Matrigel® diluído em cada poço e incubado em temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, o excesso foi retirado e os poços gentilmente lavados com PBS.

As regiões do bulge dissecadas foram cultivadas individualmente nos poços com diferentes substratos e mantidos com 150  $\mu\text{l}$  dos diferentes meios durante 24 horas a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  e 95% de umidade para favorecer a adesão. Após este período, foram acrescentados 350  $\mu\text{L}$  dos meios. Foram cultivados pelo menos 5 bulges em cada condição durante 14 dias, sendo o meio de cultivo trocado a cada 3 dias.

#### 4.3.2 Cultivo organotípico do folículo piloso

O cultivo organotípico foi realizado conforme descrito por Su e colaboradores (2015). Este método de cultivo permite que folículos pilosos isolados na fase de crescimento (anágena) sejam mantidos *in vitro* enquanto continuam a produzir pelos, possibilitando a avaliação de substâncias que possam estimular o crescimento do pelo. Para tal, foram dissecados folículos pilosos de camundongos, mantendo-os íntegros (incluindo a cápsula que o reveste). Os folículos na fase anágena foram selecionados e mantidos isoladamente em suspensão em meio Williams

E (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 10 µg/ml de insulina 10 ng/ml de hidrocortisona e antibióticos, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Os folículos isolados foram divididos em dois grupos, (1) grupo controle contendo o meio base acrescido de 10% de DMEM e (2) grupo tratado que recebeu 10% de MC-CPDm. Foram isolados folículos pilosos de dois camundongos e aqueles encontrados na fase anágena foram distribuídos igualmente nos dois grupos, totalizando 15 folículos para cada grupo. O crescimento dos pelos foi acompanhado por meio de fotografias nos dias 0, 3 e 5 e o comprimento dos pelos foi medido com o auxílio do software ImageJ.

#### 4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para verificação da viabilidade celular, foi aplicado o ensaio de MTS (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Trata-se de um método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], na presença de um acoplador de elétrons (etosulfato de fenanzina-PES), em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan). Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorvância. Para a realização do ensaio, fibroblastos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10<sup>3</sup> células/poço) e mantidos em condição de cultivo por 24 horas para permitir a adesão. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído por 100 µl de DMEM acrescido de MC-CPDh ou DMEM sem SBF (controle). Após 24 ou 48 horas, foi adicionado MTS (15 µl), que foi mantido por 3 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Logo após, 80 µl do sobrenadante de cada poço foram transferidos para nova placa e realizada a leitura da absorvância em leitora de microplacas (Spectramax Paradigm) em comprimento de onda ajustado para 490 nm.

#### 4.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi analisada através do ensaio de incorporação do 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, Invitrogen), um análogo da timidina que se incorpora ao DNA das células que estão proliferando. Este ensaio foi realizado conforme instruções do fabricante e utilizado tanto na avaliação dos efeitos biológicos do MC-CPDm quanto do MC-CPDh, seguindo para ambos os mesmos parâmetros do

ensaio, variando apenas a concentração do meio condicionado (explicado no item 4.2). Desta forma, fibroblastos (3T3 ou dérmicos humanos) foram cultivados em placas de 24 poços ( $10^4$  células/poço) ou 96 poços ( $2 \times 10^3$  células/poço) e, após o período de adesão, foram mantidos por 12 horas em DMEM sem SBF a fim de uniformizar o perfil proliferativo em relação à condição controle. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído pelo tratamento em questão (MC-CPDm ou MC-CPDh) ou DMEM sem SBF (controle). Após 12 horas, foi adicionado BrdU (1:100) em todos os poços e mantido por mais 24 horas em condições de cultivo. Decorrida a incubação com BrdU, as células foram fixadas com formaldeído 4% durante 30 minutos, seguido de lavagem com PBS e permeabilização com 0,25% de Triton-X100 (Sigma) por 30 minutos. As células foram então incubadas com ácido clorídrico 2N por dois períodos de 15 minutos a 37°C, lavadas com PBS e incubadas com tampão borato por 10 minutos. Os poços contendo as células foram novamente lavados com PBS, incubados com solução de bloqueio por 40 minutos (PBS com 5% de SBF) e submetidos à marcação imunocitoquímica utilizando anticorpo primário anti-BrdU (IgG2a de rato, 1:100, Abcam) seguido do anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 anti-IgG de rato, 1:500, Invitrogen). Os núcleos foram corados com 4',6-diamino-2-fenilindole (DAPI, Sigma) e a proliferação celular foi expressa como proporção de células BrdU positivas, obtida por contagem direta dos núcleos corados com DAPI. Três experimentos independentes foram realizados em triplicada e foram contados cinco campos de cada poço.

#### 4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO OU WOUND HEALING *IN VITRO*

Para avaliar a migração celular, *in vitro*, foi utilizado o ensaio de *wound healing* ou *scratch assay* (ZHANG *et al.*, 2013). Este método mimetiza a migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo* e foi utilizado tanto na avaliação do MC-CPDm quanto do MC-CPDh, seguindo para ambos os mesmos parâmetros do ensaio, variando apenas a concentração do meio condicionado (explicado no item 4.2). Para isso, fibroblastos murinos (3T3) ou dérmicos humanos foram mantidos em placas de 24 poços nas condições padrões de cultivo, até atingirem confluência de aproximadamente 90%. Após este período foi realizada uma raspagem na camada de células utilizando ponteira de 100  $\mu$ L. Os poços foram lavados com PBS para retirada dos *debris* celulares. Em seguida, foi acrescentado o meio condicionado conforme condição experimental e, como controle, utilizou-se DMEM sem SBF. A

migração celular foi observada e fotografada em intervalos regulares (0, 24 e 48 horas), e as imagens obtidas comparadas e analisadas através do software ImageJ.

#### 4.7 ENSAIO DE CONTRAÇÃO DO COLÁGENO

Para avaliar a capacidade de contração do colágeno, utilizou-se o ensaio de contração do colágeno conforme descrito por (SU; CHEN, 2015). Para isso, fibroblastos murinos 3T3 foram soltos da placa e ressuspensos em solução de 1 mg/ml de colágeno tipo I em DMEM, numa concentração de  $3 \times 10^5$  células/ml. A solução de colágeno tipo I e fibroblastos foi então transferida para placas de 24 poços (500  $\mu$ l/poço) e esta foi incubada a 37°C por 30 minutos para a polimerização do gel. Após este período, os géis de colágeno I polimerizados foram gentilmente descolados da placa, passando uma ponteira pelas bordas dos poços. Em seguida, foram adicionados 600  $\mu$ l MC-CPDm diluído em DMEM sem SBF. Como controle utilizou-se DMEM sem SBF. Os poços foram fotografados (0 e 24 horas) e a área dos géis medidas e comparadas através do software ImageJ.

#### 4.8 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

A avaliação da diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos e da apoptose foram realizadas através de marcação imunocitoquímica para  $\alpha$ -SMA e caspase-3 ativada, respectivamente. Para isso, fibroblastos foram plaqueados em placas de 24 poços ( $10^4$  células/poço) ou 96 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço) e mantidos por 24 horas em estufa para permitir a adesão. Após este período, o meio contendo SBF (10%) foi substituído por DMEM sem soro e as células incubadas por adicionais 12 horas. Então, o meio de cultivo foi substituído por meio condicionado conforme condição experimental e, como controle, foram mantidos poços com DMEM sem SBF. Após 48 horas, as células foram fixadas com formaldeído 4% durante 30 minutos, seguido de lavagem com PBS e permeabilização com 0,25% de Triton-X100 por 30 minutos. Os poços contendo as células foram novamente lavados com PBS, incubados com solução de bloqueio (PBS com 5% de SBF, 40 minutos) e submetidos à marcação imunocitoquímica. Para marcação de miofibroblastos, foi utilizado anticorpo primário anti- $\alpha$ -SMA (IgG2a de camundongo, 1:300, Sigma), incubado *overnight* a 4°C, seguido do anticorpo secundário (Alexa Fluor 594 anti-IgG2a de camundongo, Invitrogen), incubado por uma hora, em temperatura ambiente. Para a

análise de apoptose, utilizou-se anticorpo primário anti-caspase3 (IgG de coelho, 1:100, Sigma) seguido do anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 anti-IgG de coelho, Invitrogen), incubados conforme citado acima. Os núcleos foram corados com DAPI e a proporção de células  $\alpha$ -SMA ou caspase-3 positivas foi dada em relação ao número total de células marcadas com DAPI. As marcações fluorescentes para os diferentes marcadores analisados foram visualizadas em microscópio epifluorescente Olympus IX71 e as imagens capturadas com a câmera Olympus DP71. Três experimentos independentes foram realizados em triplicada e foram contados pelo menos cinco campos de cada poço.

#### 4.9 WESTERN BLOT

A análise quantitativa da expressão de  $\alpha$ -SMA e avaliação da produção de proteínas de matriz extracelular (colágeno I, colágeno III e fibronectina) foi realizada através da técnica de *Western blot*.

Para extração das proteínas, fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados em placas de 6 poços e, ao atingir cerca de 80% de confluência, foram tratados com MC-CPDh por 48 horas. Decorrido este período, as células foram lisadas com tampão de extração RIPA (Thermo Fisher Scientific) acrescido de inibidores de proteases (aprotinina 2  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM e leupeptina 5  $\mu$ g/ml, todos Sigma). Em seguida, os lisados congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a  $10.000 \times g$ , durante 10 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi então coletado e a concentração proteica foi determinada através do ensaio colorimétrico (Bio-Rad *DC Protein Assay*), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) com 5 pontos com concentrações entre 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l e 5  $\mu$ g/ $\mu$ l. As amostras foram preparadas em tampão de amostra 4x e agente redutor 10x NuPAGE (Invitrogen) para aplicação no gel de eletroforese.

Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada com corrente de 20 mA e voltagem constante de 60mV para entrada e 120 mV para corrida, até a visualização da passagem das amostras e do padrão de peso molecular (Spectra Multicolor – Invitrogen).

As proteínas do gel foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose durante 10 minutos sob corrente de 1.3 A voltagem de 25 V no sistema Piere Power (Thermo Fisher Scientific) em tampão de transferência (Thermo Fisher Scientific). Para confirmação de transferência foi aplicado o corante Ponceau sobre a membrana.

Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 40 minutos com leite desnatado 5% em tampão TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM - pH 7,4) e, a seguir, lavadas com TBS-T (TBS + 0,05% Tween 20). Por fim, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários listados na tabela 2 a 4°C, sob agitação, *overnight*.

Para detecção dos complexos imunes, após três lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários específicos (Tabela 2) conjugados à peroxidase. Após novas lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas para revelação com kit de detecção de peroxidase (Amersham ECL Western blotting analysis system - GE), digitalizadas por fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad) e a densitometria das bandas foi realizada pelo software ImageJ.

A análise de  $\alpha$ -SMA foi também realizada em fibroblastos murinos 3T3 tratados com o MC-CPDm, seguindo os mesmos padrões deste protocolo.

**Tabela 2 Anticorpos primários e secundários utilizados para *western blot***

<b>Anticorpo primário (marca)</b>	<b>Isotipo do anticorpo primário</b>	<b>Diluição do anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo secundário (marca)</b>	<b>Diluição do anticorpo secundário</b>
Anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma)	IgG1 de camundongo	1:5000	Anti-IgG de camundongo (GE)	1:10000
Anti- $\alpha$ -SMA (Sigma)	IgG2a de camundongo	1:5000	Anti-IgG de camundongo (GE)	1:10000
Anti-colágeno I (Novus Biological)	IgG de coelho	1:2000	Anti-IgG de coelho (GE)	1:20000
Anti-colágeno III (Novus Biological)	IgG de coelho	1:2000	Anti-IgG de coelho (GE)	1:20000
Anti-fibronectina (Sigma)	IgM de camundongo	1:2000	Anti-IgM de camundongo (Invitrogen)	1:2000

#### 4.10 MODELO DE FOTOENVELHECIMENTO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS COM RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B

A fim de estabelecer um modelo de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos humanos, utilizou-se a fotestimulação por radiação UVB. Para isso, foi utilizado um aparato totalmente fechado, para eliminar a incidência de outras radiações, a qual foi acoplado uma lâmpada ultravioleta (Vilber Lourmat). A lâmpada foi posicionada a uma altura de 22 cm, na qual a intensidade da radiação UVB (312 nm) foi de 34  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Para definição das doses, os fibroblastos dérmicos foram expostos a essa intensidade em períodos de tempo diferentes, conforme tabela 3. Para realização dos procedimentos de fotoestimulação, fibroblastos dérmicos de três doadores foram plaqueados em placas de 96 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço). Após adesão (24 horas), o meio de cultivo foi retirado e as células mantidas em 100  $\mu\text{l}$  de PBS durante a exposição às diferentes doses de radiação UVB. Como controle, fibroblastos foram mantidos em PBS, sem exposição à radiação UVB, em temperatura ambiente por 20 minutos. Decorrido o tempo de exposição, as células foram incubadas com DMEM suplementado com 10% SBF.

Foi realizada curva de viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas após a exposição à radiação UVB, pelo ensaio de MTS conforme descrito no item 4.4. A partir destes resultados, foi selecionada a dose subletal de UVB, com diminuição na viabilidade sem causar morte celular evidente, para prosseguir nas análises de senescência celular e assim, evidenciar o fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos.

**Tabela 3 Tempo de exposição dos fibroblastos dérmicos à radiação UVB na intensidade de  $34\mu\text{W}/\text{cm}^2$  e suas respectivas doses.**

Dose	Tempo
2,5 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	1 min. 15 seg.
5 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	2 min. 27 seg.
10 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	4 min. 54 seg.
20 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	9 min. 48 seg.
40 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	14 min. 42 seg.
50 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	24 min. 36 seg.
100 $\text{mJ}/\text{cm}^2$	49 min. 12 seg.

#### 4.11 ANÁLISE DE INDICADORES DE FOTOENVELHECIMENTO

O fotoenvelhecimento induz os fibroblastos a entrarem no processo de senescência celular, que têm como característica a diminuição do potencial replicativo, aumento de células positivas para  $\beta$ -galactosidase e regulação de genes associados à senescência (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017). Para confirmar se a dose de radiação UVB escolhida resultou no fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos, foi realizada a coloração de  $\beta$ -galactosidase com kit comercial *Senescence cells histochemical staining kit* (Sigma) seguindo informações do fabricante, além da avaliação da expressão de p21, proteína relacionada à senescência celular, pela técnica de *Western blot*.

A coloração de  $\beta$ -galactosidase foi realizada em fibroblastos cultivados em placas de 96 poços, 72 horas após a exposição à radiação UVB nas doses de 2,5, 5 e 10mJ/cm<sup>2</sup>, conforme descrito acima. Para a coloração, as células foram fixadas com solução de fixação (2% formaldeído/0,2% glutaraldeído) por 10 minutos e incubadas *overnight* com a solução de coloração  $\beta$ -galactosidase a 37°C. A população de células  $\beta$ -galactosidase positivas foi determinada pela contagem de células coradas de azul ciano em relação ao número total de células, observadas em microscópio de contraste de fase (Olympus IX71). Três experimentos independentes foram realizados em triplicada sendo contados cinco campos de cada poço.

Para avaliação da expressão de p21, os fibroblastos foram cultivados em placas de 35mm até atingirem 80-90% de confluência, quando foram expostos à radiação UVB na dose de 5 mJ/cm<sup>2</sup> e mantidos em cultivo por mais 48 horas. Em seguida, foi realizada a extração das proteínas seguida de imunodeteção por *Western blot*, conforme descrito no item 4.9. Para imunodeteção foram utilizados os anticorpos primários anti-p21 (IgG de camundongo, 1:500, BD) seguido do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:20000, GE) conjugado à peroxidase.

#### 4.12 SEPARAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES A PARTIR DO MC-CPDH

Para avaliar o possível envolvimento de VE, presentes no MC-CPDh (VE-CPDh), sob os efeitos biológicos observados em fibroblastos

dérmicos, foram obtidas e avaliadas duas frações do procedimento de ultracentrifugação descrito abaixo: uma contendo as VE-CPDh e outra o sobrenadante da ultracentrifugação contendo os fatores solúveis do MC-CPDh mas depletado de VE. Para isso, as VE-CPDh foram isoladas por ultracentrifugação, conforme descrito por Théry e colaboradores (2006) com modificações. Para isso, as CPDh foram cultivadas da mesma forma que para a coleta do MC-CPDh, descrito no item 4.2. Após as 48 horas de incubação com DMEM sem SBF, o MC-CPDh foi coletado e submetido a centrifugações sequenciais para eliminação gradativa de *debris* celulares (300 xg por 10 min, 2.000 xg por 10 min, 10.000 xg por 30 min – a 4°C), resgatando o sobrenadante ao final de cada centrifugação. O isolamento das VE-CPDh foi realizado através de ultracentrifugação a 100.000 xg por 2 horas a 4°C, em rotor SW41Ti (Beckman-Coulter). O sobrenadante contendo os fatores solúveis e desprovido de VE foi recolhido para utilização posterior e o precipitado de VE-CPDh foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições. Ao final, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as VE-CPDh ressuspensas em 100µl de DMEM para posterior utilização.

#### **4.12.1 Ensaio de incorporação de VE-CPDh por fibroblastos dérmicos humanos**

A fim de confirmar o isolamento de VE-CPDh e avaliar se as mesmas são incorporadas por fibroblastos, as VE-CPDh foram coradas e monitoradas conforme descrito por El-Andaloussi e colaboradores (2012). Seguindo este protocolo, o corante de membrana celular CellMask (1,25µg/ml - Life Technologies) foi adicionado ao meio condicionado antes da primeira ultracentrifugação nas condições citadas acima. Após ultracentrifugação, o precipitado de VE-CPDh foi ressuspense em PBS, transferido para um tubo limpo para segunda ultracentrifugação. Neste passo é importante que o sobrenadante seja completamente descartado com o auxílio de uma pipeta, e a fração contendo as VE-CPDh seja transferida para um tubo limpo, evitando resíduo de corante. Ao final da segunda ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e as VE-CPDh coradas ressuspensas em 100µl de DMEM. Em seguida, monocamadas de fibroblastos dérmicos foram incubadas com as VE-CPDh coradas e mantidos por 24 horas, seguido de fixação com formaldeído 4% e coloração dos núcleos com DAPI. A incorporação das VE-CPDh por estas células foi observada em

microscópio de fluorescência (Olympus IX83). Fibroblastos não tratados foram mantidos como controle da autofluorescência das células.

#### **4.12.2 Avaliação do efeito das VE-CPDh sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos**

O ensaio de proliferação celular pela incorporação do BrdU foi utilizado para a avaliação dos efeitos biológicos das VE-CPDh sobre fibroblastos dérmicos humanos. Para isso, VE-CPDh e o sobrenadante da ultracentrifugação contendo os fatores solúveis de CPDh mas desprovido de VE foram separados conforme descrito no item 4.12 e utilizados no tratamento de fibroblastos e ensaio de proliferação celular (item 4.5). Assim como no ensaio utilizando o MC-CPDh, as concentrações de VE-CPDh e o volume do sobrenadante foram ajustadas pelo número células produtoras ( $5 \times 10^5$  células) e diluído em DMEM sem SBF. Como controle, os fibroblastos foram mantidos pelo mesmo período em DMEM sem SBF.

#### **4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis contínuas foram expressas como médias  $\pm$  desvio padrão e comparadas entre os grupos usando teste t ou, em experimentos específicos, Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. A significância estatística foi definida como um valor de  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.

## 5. RESULTADOS

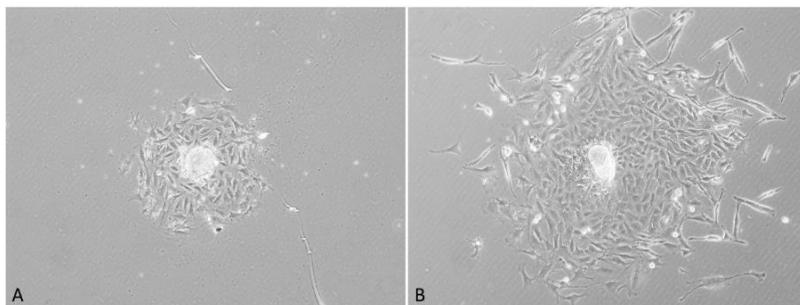
### Parte I – Efeito do MC-CPDm no crescimento de vibrissas de camundongo e ativação de fibroblastos murinos

#### 5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CPDm

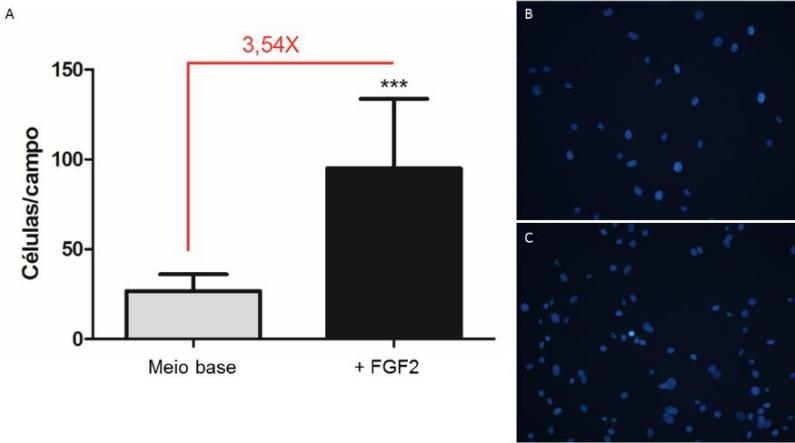
Com o intuito de estudar os efeitos parácrinos das CPD, primeiramente foi padronizado o isolamento e expansão destas células a partir da papila dérmica de camundongos. As papilas dérmicas foram isoladas das vibrissas de camundongos por dissecação mecânica e cultivadas em meio de cultivo base (DMEM com SBF) ou com suplementação de FGF2, como descrito no item 4.1.1 dos Materiais e Métodos. Após 5 dias de cultivo, em ambas as condições foi possível observar a migração de células com a morfologia fibroblástóide característica, a partir dos explantes das papilas dérmicas. Na condição com suplementação de FGF2, as células formavam colônias visivelmente maiores, (Figura 6) e quando repicadas para expansão, apresentaram 3.5 vezes mais células do que com meio base (Figura 7).

Desse modo, o meio DMEM suplementado com 20% SBF e 10 ng/ml de FGF2 passou a ser utilizado para isolamento das CPD nos primeiros 5 dias de cultivo primário (a partir do explante de papila dérmica), seguido pela substituição por DMEM suplementado com 10% SBF e 10 ng/ml de FGF2 para expansão celular e passagens.

**Figura 6 Cultivo primário das CPDm.** Fotos representativas da migração de CPDm para a placa após 5 dias de cultivo. (A) DMEM+20% SBF (B) DMEM+20% SBF+10 ng/ml FGF2. Escala: 200  $\mu$ m



**Figura 7 Expansão das CPDm em meio base ou com suplementação de FGF2.** (A) Gráfico da quantificação de células por campo nas condições meio base e com suplementação de FGF2. Imagens representativas do número de células por campo em (B) meio base e (C) com suplementação de FGF2. Núcleos corados com DAPI. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 15 campos contatos em cada condição. \*\*\* $p < 0,0001$  por teste t. Escala: 50  $\mu$ m



## 5.2 ANÁLISE DO MC-CPDm SOBRE O FOLÍCULO PILOSO

A seguir foi investigado o efeito parácrino do MC-CPDm sobre as células epidermais do folículo piloso e na modulação do crescimento do pelo em modelo murino, utilizando cultura de explante da região do bulge e o cultivo organotípico da vibrissa íntegra, respectivamente.

### 5.2.1 Cultivo das células epidermais do folículo piloso

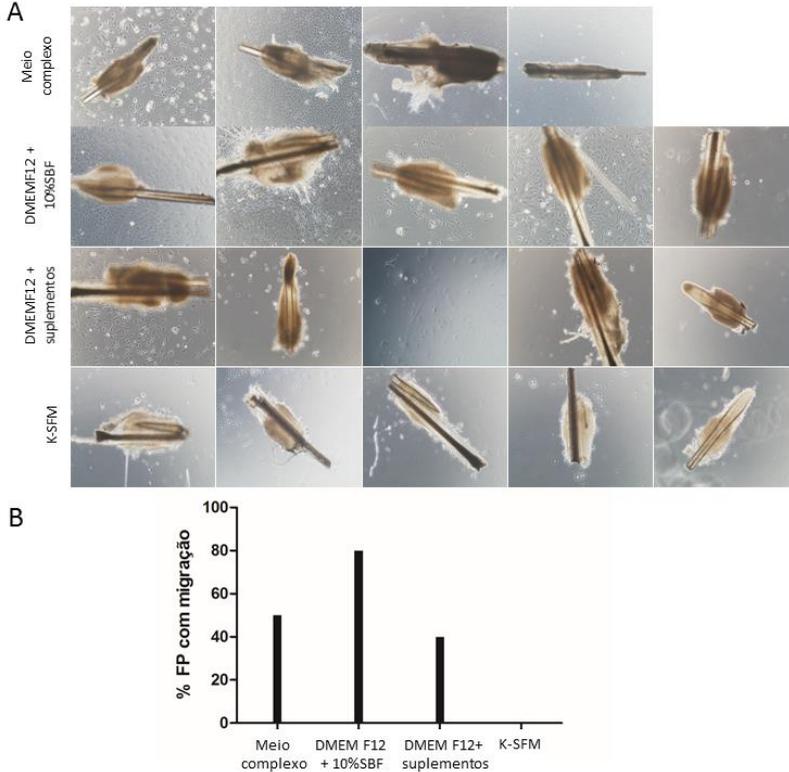
Para analisar o possível efeito do MC-CPDm sobre as células epidermais do folículo piloso buscou-se padronizar o cultivo de explante da região do bulge, considerada um nicho de células-tronco. Desta forma, os folículos pilosos foram dissecados, as regiões do bulge isoladas e cultivadas sobre Matrigel® ou sobre colágeno I. Em ambos substratos foram testados quatro diferentes meios de cultivo descritos acima no item 4.3.1.

Sobre o Matrigel®, as regiões do bulge não apresentaram migração de células em nenhum dos meios testados. Já sobre o colágeno

I, o cultivo em meio DMEM/F12 acrescido de 10% de SBF resultou em maior número de bulges com migração celular (80% dos bulges). Enquanto que 50% dos bulges apresentaram migração de células no meio complexo e 40% no meio DMEM/F12 com suplementos. Por outro lado, as regiões do bulge cultivadas em meio K-SFM não apresentaram migração de células (Figura 8). Nas condições que apresentaram migração celular, foram observadas populações distintas, tanto em morfologia como em quantidade de células migradas, e ainda, a ausência de expressão de marcadores de células-tronco epidermais (citoqueratina 14, citoqueratina 15 e CD34 – dados não apresentados). O diferente padrão migratório entre as regiões do bulge, inclusive entre aqueles cultivados com o mesmo meio de cultivo, pode ser visualizado na figura 8A.

Devido à falta de homogeneidade na migração celular dos explantes mantidos nas mesmas condições de cultivo somado à ausência do fenótipo epidermal nas células que migraram, considerou-se que este método não é adequado para as análises.

**Figura 8 Cultivo da região do bulge sobre colágeno I** (A) Imagens das regiões do bulge cultivados sobre colágeno com diferentes meios de cultivo, revelando o diferente padrão migratório entre as regiões do bulge. (B) Gráfico da proporção de bulges que apresentaram células migrando para a placa de cultivo.



### 5.2.2 Cultivo organotípico do folículo piloso

O cultivo organotípico possibilita a manutenção de folículos pilosos viáveis *ex vivo* e se mostra como uma abordagem *in vitro* próxima do processo de crescimento do pelo *in vivo* (LANGAN *et al.*, 2015). Como as CPD influenciam o crescimento do pelo (YANG; COTSARELIS, 2011) este foi considerado um bom modelo para avaliação da atividade indutora e controle positivo do efeito parácrino do MC-CPDm.

Para a padronização do método no LACERT, os folículos pilosos íntegros de vibrissa de camundongos foram cultivados em suspensão em meio base William E com suplementos durante 5 dias. A figura 9 apresenta os resultados, sendo possível observar o evidente crescimento do pelo nesse período. Vale ressaltar que a padronização e inserção deste método no LACERT, além de trazer resultado para o presente trabalho, poderá ser utilizado em diversos outros estudos da biologia e mecanismos envolvidos no ciclo do pelo, bem como para teste de substâncias que podem estimular seu crescimento.

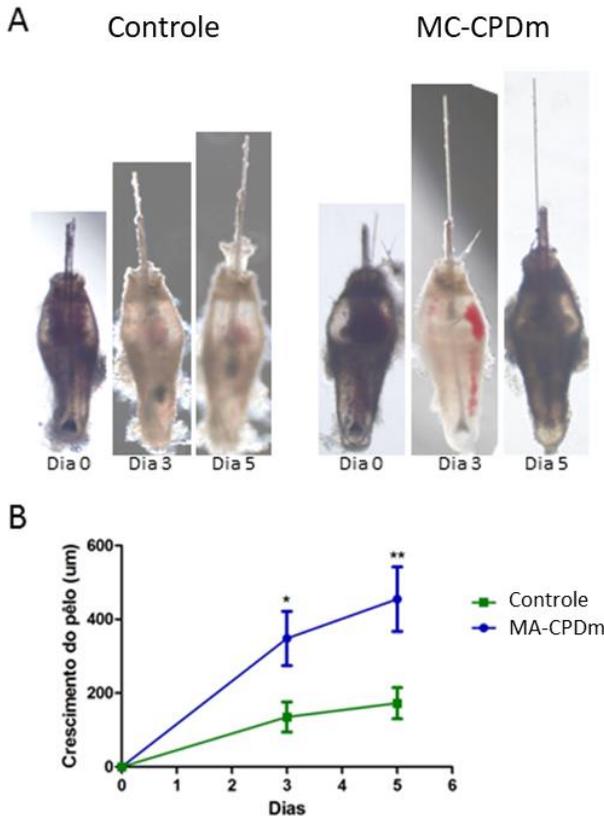
**Figura 9 Padronização do cultivo organotípico.** Folículo piloso íntegro da vibrissa de camundongo cultivado por 5 dias em suspensão em meio específico demonstrando evidente crescimento do pelo.



Na sequência, foi avaliado o efeito do MC-CPDm sobre o crescimento do pelo. Como condição controle, foi aplicado o meio base William E contendo 10% de DMEM (meio utilizado para a produção do MC-CPDm) e para teste 10% de MC-CPDm diluído em meio base. Os resultados demonstram que o tratamento com MC-CPDm aumentou significativamente o crescimento do pelo após 3 e 5 dias (2,6 vezes, em ambos os dias), como representados na Figura 10. Desta forma, é possível sugerir que o MC-CPDm é rico em fatores de crescimento e biomoléculas, apresentando efeito parácrino na regulação do ciclo do crescimento do pelo.

A partir destes resultados, foi avaliada a influência do MC-CPDm sobre fibroblastos, os quais desempenham papel central na biologia da pele e na manutenção da matriz extracelular dérmica além de participarem do processo de reparo cutâneo.

**Figura 10 Efeito do MC-CPDm sobre o crescimento do pelo.** (A) Imagens representativas dos folículos pilosos íntegros cultivados na ausência e presença de MC-CPDm nos dias 0, 3 e 5. (B) Gráfico demonstrando o aumento significativo do crescimento do pelo quando cultivado com MC-CPDm, em relação ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 12 folículos pilosos de vibrissas de camundongos medidos em cada condição \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  por ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni.

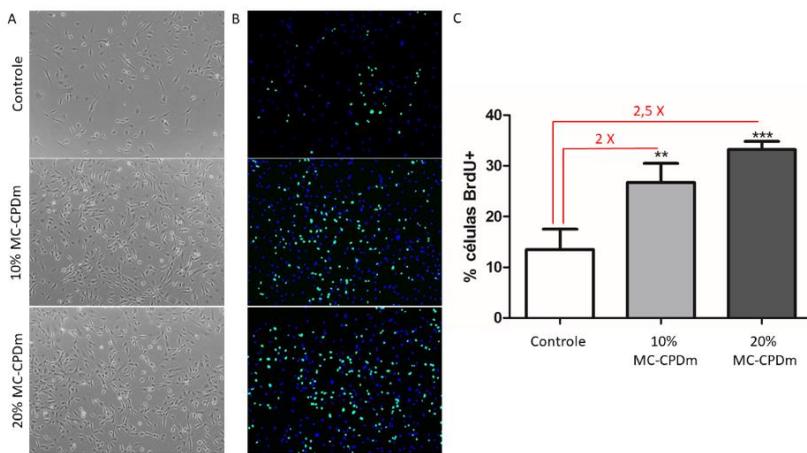


### 5.3 MC-CPDm INDUZ A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS

Tendo em vista que a proliferação de fibroblastos é um aspecto importante no início do processo de reparo cutâneo (GURTNER *et al.*, 2008), o MC-CPDm foi avaliado sobre este mecanismo celular. Fibroblastos murinos (3T3) foram cultivados durante 36 horas em 10%

ou 20% de MC-CPDm diluído em DMEM sem SBF, sendo a proliferação avaliada nas últimas 24 horas com a incubação de BrdU. A taxa proliferativa foi representada pela porcentagem de células BrdU positivas em relação ao total de células marcadas com DAPI, sendo observado uma taxa de 13,48% no controle (DMEM sem SBF). Já na condição com 10% de MC-CPDm a taxa proliferativa foi de 26,7% e 33,22% na condição com 20% MC-CPDm. Estes valores representaram, respectivamente, aumentos de 2 e 2,5 vezes em comparação ao controle, conforme mostra o gráfico apresentado na Figura 11C. Não foram observadas mudanças morfológicas evidentes nos fibroblastos cultivados na presença ou ausência MC-CPDm (Figura 11A). Estes dados indicam que o MC-CPDm induziu a proliferação de fibroblastos sem alterar sua morfologia.

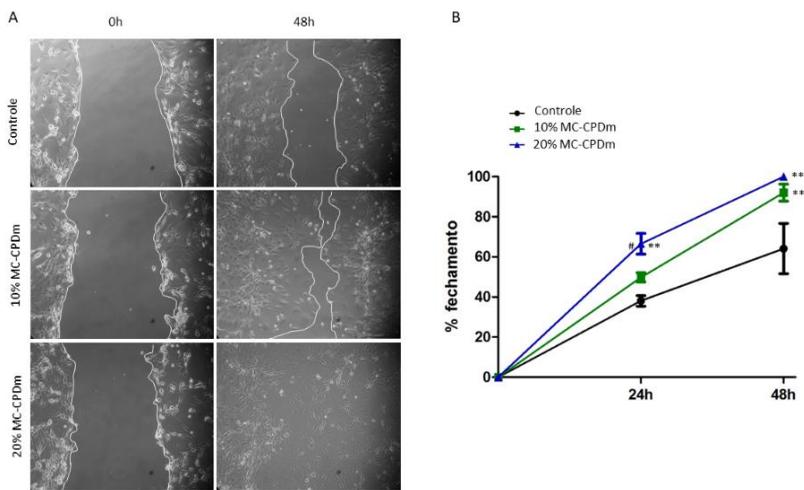
**Figura 11 Efeito do MC-CPDm na proliferação de fibroblastos 3T3.** (A) Imagens representativas da morfologia das células após 36 horas. (B) Imagens representativas das células BrdU positivas (verde) em relação ao total de células marcadas com DAPI (azul). (C) Gráfico da porcentagem de células BrdU positivas cultivadas na ausência (controle) ou contendo 10% e 20% de MC-CPDm. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes (15 campos/replicata). \*\* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,01$  por teste t, em relação ao controle. Escala: 100  $\mu$ m.



#### 5.4 MC-CPDm ESTIMULA A MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS E FECHAMENTO DE LESÃO IN VITRO

Durante o processo de reparo cutâneo, além da proliferação de fibroblastos, a migração destes para o local da lesão é fundamental para o reestabelecimento da homeostase do tecido (GURTNER *et al.*, 2008). Para avaliar o potencial do MC-CPDm em induzir a migração de fibroblastos, foi realizado o ensaio de *wound healing in vitro*. Este ensaio mimetiza, o processo de fechamento de uma lesão ocasionada pela raspagem da monocamada de fibroblastos em uma região da placa de cultivo e acompanhamento da migração das células adjacentes para esta região. O percentual de fechamento da área da monocamada lesionada foi analisado 24 e 48 horas após a raspagem e adição de 10 ou 20% de MC-CPDm. A Figura 12 mostra o perfil de migração de fibroblastos tratados MC-CPDm. Após 24 horas, a proporção de fechamento da lesão foi de aproximadamente 40% no controle (DMEM sem suplemento), 50% com 10% de MC-CPDm e 67% com 20% de MC-CPDm, sendo a diferença significativa em relação ao controle apenas nesta última condição. Contudo após 48 horas, a proporção de fechamento da lesão foi de 64% no controle, 92% na condição com 10% de MC-CPDm e 100% na condição com 20% de MC-CPDm, sendo a diferença significativa em ambos tratamentos em comparação ao controle. Com estes resultados, fica evidente o efeito do MC-CPDm sobre a migração de fibroblastos e potencial de fechamento de lesão. Além disso, em 24 horas de cultivo foi possível observar diferença estatística entre as condições com 10% e 20% de MC-CPDm, indicando efeito dose dependente.

**Figura 12 Efeito do MC-CPDm na migração de fibroblastos 3T3 e fechamento de lesão *in vitro*.** (A) Imagens representativas imediatamente e 48 horas após a lesão. O limite da migração das células é representado pela linha branca (B) Gráfico representando a porcentagem de fechamento de lesões *in vitro* cultivadas na condição controle ou em 10% e 20% de MC-CPDm diluído em DMEM sem SBF. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata (2 medidas/replicata). \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle, # $p < 0,05$  10% MC-CPDm versus 20% MC-CPDm, por ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni. Escala: 200  $\mu$ m.



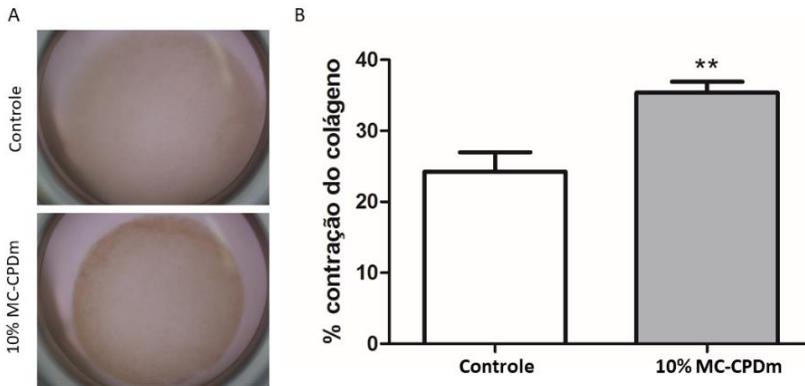
### 5.5 EFEITO DO MC-CPDm NA CONVERSÃO FIBROBLASTO-MIOFIBROBLASTO E CONTRAÇÃO DO COLÁGENO

Outra forte contribuição dos fibroblastos dérmicos, em um contexto de reparo cutâneo, é a sua conversão para miofibroblastos (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). Assim, a conversão fibroblasto-miofibroblasto foi avaliada pelo o ensaio de contração de colágeno e pela análise da expressão de  $\alpha$ -SMA.

Para avaliar o efeito de forma funcional, foi realizado o ensaio de contração do colágeno. Neste ensaio, fibroblastos 3T3 foram cultivados tridimensionalmente em géis de colágeno tipo I e seu potencial de contração foi medido através da diminuição da área dos géis. Os resultados demonstraram diminuição significativa da área dos géis de colágeno mantidos em 10% de MC-CPDm, representado pela maior

proporção de contração (35,37%) quando comparado ao controle (24,26%), conforme demonstrado na Figura 13.

**Figura 13 Efeito do MC-CPDm sobre a contração de colágeno por fibroblastos.** (A) Imagens representativas dos géis de colágeno após 24 horas. (B) Gráfico da porcentagem da diminuição da área dos géis de colágeno após 24 horas de cultivo na ausência (controle) ou contendo 10% MC-CPDm. \*\* $p < 0,01$  por teste t.

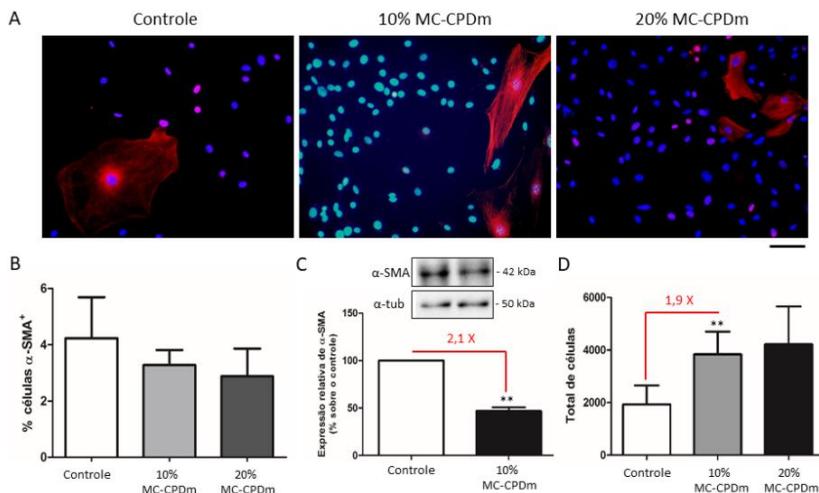


A seguir, a expressão de  $\alpha$ -SMA, marcador de miofibroblastos, foi avaliada por imunofluorescência e *Western blot* após 48 horas de tratamento com MC-CPDm. A proporção de células positivas para  $\alpha$ -SMA foi equivalente nas condições tratadas com 10% (3,28%) ou 20% (2,88%) de MC-CPDm e no controle (4,23%) (Figura 14 A e B). Todavia, a quantificação por *Western blot* demonstrou redução de 2,1 vezes na expressão proteica de  $\alpha$ -SMA na condição tratada com MC-CPDm em relação ao controle (Figura 14 C), sugerindo redução na conversão fibroblasto-miofibroblasto. Neste sentido, o aumento na contração do gel de colágeno pode ser explicado pelo aumento no número de fibroblastos, que proliferam nesta condição (como demonstrado na Figura 11) e também apresentam potencial contrátil (LI *et al.*, 2015).

Para confirmar essa hipótese, o número total de células foi quantificado revelando que os cultivos tratados com MC-CPDm por 48 horas alcançaram o dobro de células em relação ao controle (Figura 14D), sugerindo que o aumento da contração de colágeno promovido

pelo MC-CPDm se deve de fato ao maior número de células totais e não de miofibroblastos especificamente.

**Figura 14 Efeito do MC-CPDm sobre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos.** (A) Imagens representativas das células  $\alpha$ -SMA (vermelho) em relação ao total de células marcadas com DAPI (azul). (B) Gráfico da porcentagem de células positivas para  $\alpha$ -SMA após 48 horas de cultivo na ausência (controle) ou contendo 10% e 20% de MC-CPDm. (C) Gráfico da expressão relativa de  $\alpha$ -SMA por *Western blot*. As bandas foram quantificadas por densitometria e o gráfico representa a relação entre  $\alpha$ -SMA e  $\alpha$ -tubulina (controle interno de expressão). O controle foi considerado 100% e os valores obtidos na condição tratada com 10% de MC-CPDm foram calculados em relação ao controle. (D) Quantificação do número total de células após 48 horas de cultivo na ausência (controle) ou contendo 10% e 20% de MC-CPDm. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes,  $**p < 0,01$ , por teste t. Escala: 50  $\mu$ m.



## Parte II – Efeito do MC-CPDh sobre a ativação de fibroblastos dérmicos humanos e produção de matriz extracelular

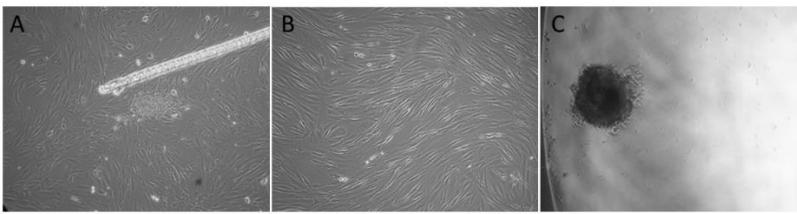
Visando a potencial aplicação biotecnológica e clínica do MC-CPD na potencialização do reparo cutâneo e da qualidade das cicatrizes

por meio da ativação do remodelamento dérmico, os próximos experimentos foram realizados em células humanas.

## 5.6 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CPDh

O isolamento de papilas dérmicas de folículos pilosos humanos é bastante semelhante ao procedimento com vibrissas de camundongos, com exceção à presença da capsula colágena presente apenas neste último. Além disso, a papila dérmica humana é menor do que a de camundongo e, por este motivo, foi necessário fixá-la à placa de cultivo com o auxílio de uma agulha fina. Com base nos experimentos de padronização do cultivo de CPDm, as CPDh foram cultivadas em meio contendo FGF2. As células que migraram para a placa de cultivo apresentaram a morfologia fibroblastóide característica, porém o início e a velocidade da migração se mostraram variáveis entre os diferentes explantes. A figura 15A mostra as CPDh após 17 dias de cultivo primário. CPDh de três doadores foram isoladas e expandidas até terceira passagem mantendo a morfologia fibroblastóide característica, como pode ser observado na figura 15B. Na terceira passagem, foi realizado o ensaio de formação de esferas em gota pendente, no qual foi possível observar que as células mantiveram a propriedade agregativa e formaram esferas únicas em cada gota (Figura 15C). A propriedade agregativa é característica das CPD e a sua manutenção ao longo da expansão celular é importante para manter a capacidade indutiva parácrina sobre o folículo piloso (HIGGINS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). As esferas foram então dissociadas, homogeneizadas em meio de cultivo e plaqueadas em condições aderentes para coleta do MC-CPDh.

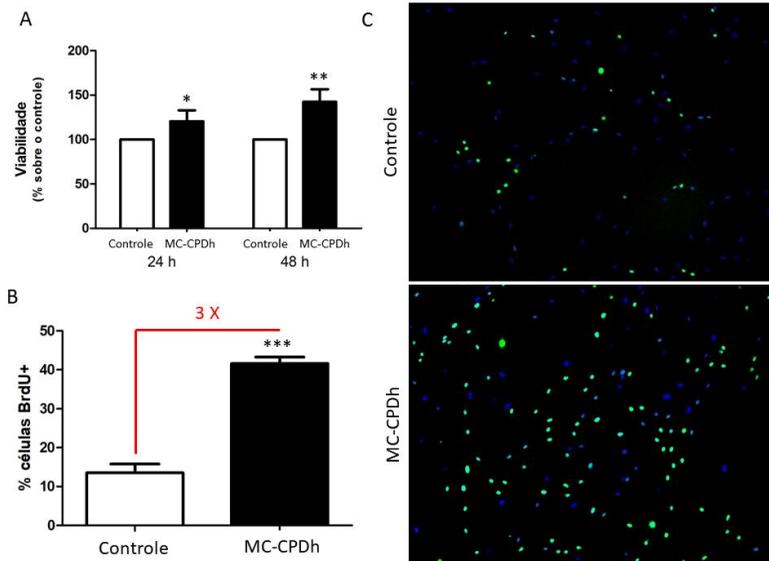
**Figura 15 Cultivo das CPDh.** Imagens representativas da (A) migração de CPDh após 17 dias em cultivo primário, (B) morfologia das CPDh humanas em terceira passagem e (C) formação de esfera pelas CPDh em terceira passagem após 48 horas de cultivo em gota pendente. Escala 200µm.



## 5.7 O MC-CPDh ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

O MC-CPDh foi então avaliado quanto ao efeito sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos, através dos ensaios de MTS e de incorporação do BrdU, respectivamente. As células foram tratadas com MC-CPDh (conforme descrito no item 4.2) e o ensaio de MTS realizado após 24 e 48 horas. Para condição controle, células foram mantidas em DMEM sem suplementação. Este ensaio se baseia na mensuração da atividade mitocondrial, que pode ser diretamente relacionada com a atividade celular. Os resultados representados na Figura 16A demonstram que as células cultivadas com MC-CPDh apresentaram atividade celular aumentada ao longo do tempo, quando comparado ao controle. Em 24 horas este aumento foi em torno de 20%, já em 48 horas foi cerca de 40%, sugerindo que o MC-CPDh estimula a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos. Para confirmar, foi realizado o ensaio de incorporação do BrdU, para tal os fibroblastos foram cultivados em DMEM sem suplementação (controle) ou na presença de MC-CPDh durante 36 horas, sendo a proliferação avaliada nas últimas 24 horas com a incubação de BrdU. A taxa proliferativa, representada pela porcentagem de células BrdU positivas, foi de 13,5% na condição controle enquanto na condição tratada com MC-CPDh foi de 41,6%, correspondendo a aumento de 3 vezes em relação ao controle (Figura 16B). Desta forma, é possível afirmar que o MC-CPDh estimula a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos.

**Figura 16 Efeito do MC-CPDh na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos** (A) Representação gráfica da viabilidade celular realizada pelo ensaio de MTS 24 e 48 horas após tratamento com MC-CPDh. (B) Gráfico da porcentagem de células BrdU positivas cultivadas na ausência ou contendo MC-CPDh. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  por teste t, em relação ao controle (C) Imagens representativas das células BrdU positivas (verde) em relação ao total de células marcadas com DAPI (azul).

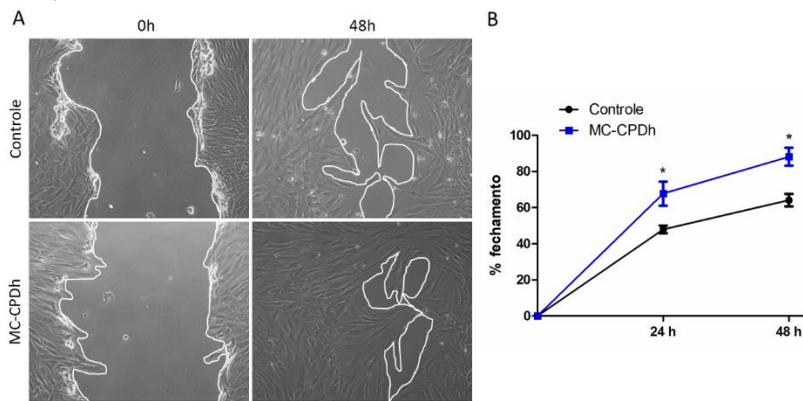


## 5.8 O MC-CPDh PROMOVE O FECHAMENTO DA LESÃO *IN VITRO* POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

A seguir, para avaliar se o MC-CPDh promove a migração de fibroblastos dérmicos e o consequente fechamento da lesão *in vitro*, foi utilizado o ensaio de *wound healing*. Após a lesão na monocamada de fibroblastos dérmicos humanos, o MC-CPDh foi adicionado e o fechamento da área lesionada analisado após 24 e 48 horas. Os resultados demonstraram que o MC-CPDh estimulou o fechamento da lesão *in vitro*, tanto em 24 quanto em 48 horas, conforme representado na Figura 17. Após 24 horas de tratamento com MC-CPDh a proporção de fechamento foi em torno de 67%, enquanto na condição controle foi de 47%. Já após 48 horas as condições tratadas com MC-CPDh

encontravam-se com cerca de 90% de sua área fechada, sendo possível observar pontos completamente fechados, enquanto na condição controle a proporção de fechamento foi de 64%. Estes dados representam um aumento de cerca de 1,4 vezes no fechamento da lesão, em ambos os tempos analisados. Desta forma, fica evidenciado que, assim como o MC-CPDm, o MC-CPDh estimula a migração de fibroblastos mostrando-se promissor para o reparo cutâneo.

**Figura 17 Efeito do MC-CPDh na migração de fibroblastos dérmicos humanos e fechamento da lesão *in vitro*.** (A) Imagens representativas imediatamente e 48 horas após a lesão. O limite da migração das células é representado pela linha branca. (B) Gráfico representando a porcentagem de fechamento de lesões *in vitro* cultivadas na ausência (controle) ou com MC-CPDh. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata (2 medidas/replicata). \* $p < 0,05$  em relação ao controle, por ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni. Escala: 200  $\mu$ m.

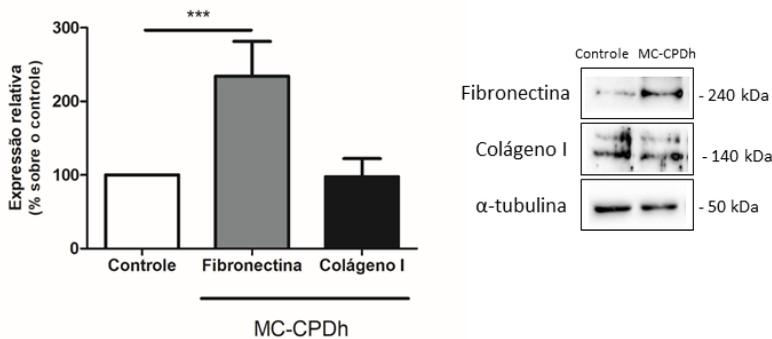


## 5.9 O MC-CPDh AFETA A PRODUÇÃO DE MEC POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

O remodelamento da MEC é uma etapa importante do final do processo de reparo, sendo o aspecto e a funcionalidade do tecido diretamente relacionados a esta etapa. Os fibroblastos são as principais células envolvidas no remodelamento da MEC dérmica através da produção de proteínas como fibronectina, colágeno I e III. Em vista disso, o MC-CPDh foi avaliado frente ao estímulo sobre fibroblastos na produção de proteínas da MEC dérmica. Para isso, fibroblastos dérmicos

foram tratados com MC-CPDh durante 48 horas e a produção de fibronectina, colágeno I e III avaliada por *Western blot*. Os resultados obtidos demonstraram que o MC-CPDh promoveu um aumento de 2,3 vezes na produção de fibronectina em relação ao controle, porém, sobre a produção de colágeno tipo I não foi observada diferença (Figura 18). A análise de colágeno tipo III também foi realizada, porém, por dificuldades técnicas, não foi possível quantificar.

**Figura 18 Efeito do MC-CPDh sobre a produção de MEC por fibroblastos dérmicos humanos.** Gráfico da expressão relativa de fibronectina e colágeno tipo I. As bandas foram quantificadas por densitometria e o gráfico representa a relação entre fibronectina ou colágeno tipo I e  $\alpha$ -tubulina. O controle foi considerado 100% enquanto os valores obtidos na condição tratada com MC-CPDh foram calculados em relação ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$  por teste t, em relação ao controle

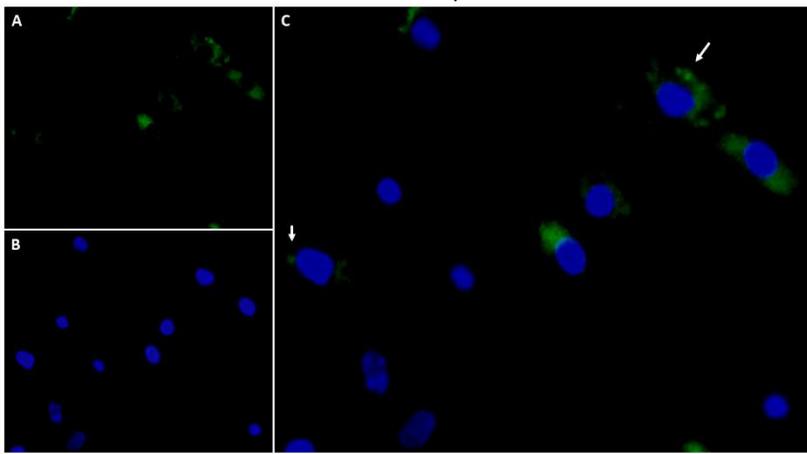


### 5.10 VE-CPDh SÃO INCORPORADAS POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

Os efeitos parácrinos em processos biológicos *in vivo* e *in vitro* são mediados por fatores solúveis ou por vesículas extracelulares, que incluem exossomos e microvesículas, secretados pelas células (PHINNEY; PITTENGER, 2017; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Para analisar a incorporação de VE-CPDh por fibroblastos, estas foram isoladas por ultracentrifugação, coradas com corante fluorescente e, em seguida, incubadas com fibroblastos dérmicos humanos por 24 horas. Na Figura 19 é possível observar fibroblastos dérmicos humanos com a membrana plasmática corada e alguns pontos fluorescentes na região

perinuclear, indicando que as VE-CPDh foram internalizadas pelas células.

**Figura 19 Incorporação de VE-CPDh por fibroblastos dérmicos humanos.** Imagens representativas da análise por microscopia de fluorescência de fibroblastos tratados com VE-CPDh coradas com corante de membrana plasmática CellMask, mostrando em (A) células com a membrana plasmática corada indicando a internalização das VE-CPDh, (B) os núcleos corados com DAPI e (C) a sobreposição dos fibroblastos marcados e os núcleos. Setas brancas indicam pontos perinucleares de acúmulo de VE-CPDh coradas. Escala: 50µm.



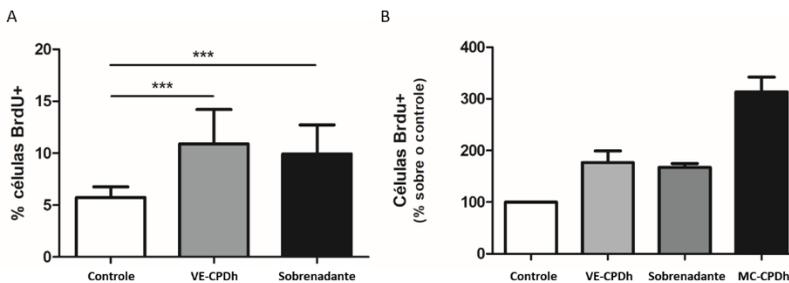
#### 5.11 A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS É ESTIMULADA TANTO PELAS VE-CPDh QUANTO POR FATORES SOLÚVEIS

As vesículas extracelulares podem conter diversas biomoléculas ativas, que incluem citocinas e fatores de crescimento, lipídeos, mRNAs e miRNA regulatórios, e estão envolvidas na comunicação celular a curta e longa distância, bem como, respostas celulares a injúrias (PHINNEY; PITTENGER, 2017). A fim de verificar se as VE-CPDh estariam mediando os efeitos promovidos pelo MC-CPDh foi realizado ensaio de proliferação celular por incorporação de BrdU em fibroblastos dermais humanos. Estes foram tratados com as VE-CPDh ou com o sobrenadante da ultracentrifugação contendo apenas fatores solúveis e, como controle, fibroblastos foram mantidos em DMEM sem SBF. A taxa proliferativa, representada pela porcentagem de células BrdU

positivas, foi de 5,75% na condição controle. Já na condição tratada com VE-CPDh foi de 10,9% e na condição tratada com o sobrenadante foi de 9,95%. Estes valores representam aumento, em ambas as condições, de aproximadamente 1,8 vezes em comparação ao controle, conforme mostra o gráfico da Figura 20A.

Em conjunto, os resultados confirmam que as VE-CPDh foram internalizadas pelos fibroblastos dérmicos humanos e exercem efeitos sobre o metabolismo destas células. Além disso, demonstram que ambos, VE-CPDh e fatores solúveis presentes MC-CPDh, atuam na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos, evidenciado quando comparado com a taxa proliferativa dos fibroblastos cultivados com MC-CPDh após normalização dos resultados para percentual do respectivo controle (Figura 20B).

**Figura 20 Proliferação de fibroblastos dérmicos humanos induzida por VE-CPDh e sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh.** (A) Gráfico da porcentagem de células BrdU positivas cultivadas com VE-CPDh ou com o sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh. Células cultivadas com DMEM sem suplementação foram consideradas controle. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. \*\*\* $p < 0,01$  por teste t, em relação ao controle. (B) Representação gráfica da taxa proliferativa dos fibroblastos cultivados com VE-CPDh, com o sobrenadante da ultracentrifugação ou com o MC-CPDh, representada em porcentagem sobre seu respectivo controle.



### **Parte III – Efeito protetor do MC-CPDh em fibroblastos humanos fotoenvelhecidos**

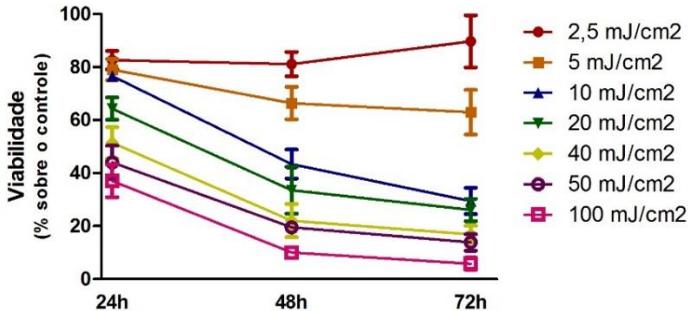
Pesquisas sobre a fisiopatologia do fotoenvelhecimento têm encontrado correlações com certos aspectos da cicatrização de feridas, especialmente relacionados à atividade de fibroblastos e produção de MEC (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; KIM *et al.*, 2007). Por este motivo, foi incluído aos estudos dos efeitos do MC-CPDh um modelo de fibroblastos fotoenvelhecidos por exposição à radiação UVB.

#### **5.12 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE FOTOENVELHECIMENTO COM RADIAÇÃO UVB**

Para determinar a dose de radiação UVB que induza o fotoenvelhecimento em fibroblastos promovendo senescência sem ocasionar a morte celular, diferentes doses foram aplicadas e a viabilidade avaliada pelo ensaio de MTS após 24, 48 e 72 horas de exposição. Como exposto na Figura 21, quando submetidas à dose de 2,5 mJ/cm<sup>2</sup> a viabilidade celular se manteve entre 80 e 90%, em relação ao controle (considerado 100%). Já na dose de 5 mJ/cm<sup>2</sup>, a viabilidade foi em torno de 80% em 24 horas, diminuindo para 66% em 48 horas e 63% em 72 horas. A estabilização da viabilidade entre 48 e 72 horas pode indicar que as células tenham falhado em recuperar o perfil proliferativo anterior à exposição à radiação UVB, indicativo de parada no ciclo celular. Com as doses mais altas (10, 20, 40, 50 e 100 mJ/cm<sup>2</sup>), foi observada diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo, sendo que em 72 horas a viabilidade variou de 40 a 10% indicando efeito letal.

Em vista destes resultados, as doses de 2,5, 5 e 10 mJ/cm<sup>2</sup> foram selecionadas para avaliação dos indicadores de fotoenvelhecimento nos experimentos a seguir.

**Figura 21 Viabilidade de fibroblastos dérmicos humanos após a exposição à radiação UVB.** Representação gráfica da viabilidade celular realizada pelo ensaio de MTS, 24, 48 e 72 horas após a exposição à diferentes doses de radiação UVB, em relação ao controle (100%). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão de amostras de 3 experimentos independentes em triplicata.



### 5.13 FIBROBLASTOS EXPOSTOS À RADIAÇÃO UVB APRESENTAM INDICADORES DE FOTOENVELHECIMENTO

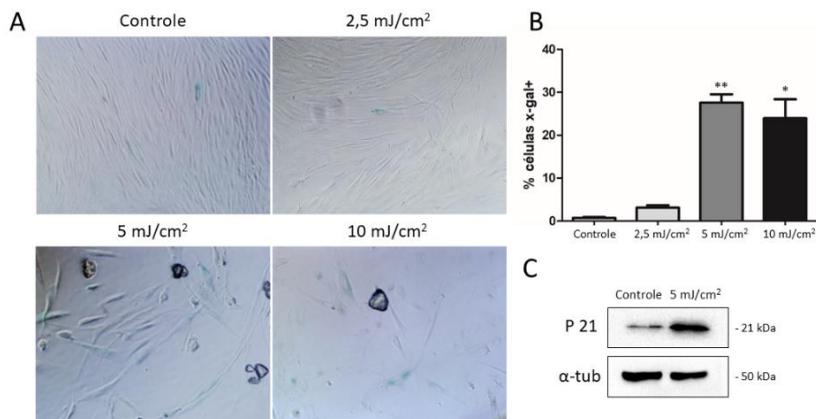
Para avaliar se as doses de 2,5, 5 e 10 mJ/cm<sup>2</sup> induziram os fibroblastos a entrarem em processo de senescência, indicativo de fotoenvelhecimento, estes foram submetidos à coloração de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados demonstraram maior proporção de células coradas em azul ciano (positivas para  $\beta$ -galactosidase) 72 horas após a exposição à radiação UVB nas doses de 5 e 10 mJ/cm<sup>2</sup> (27% e 24%, respectivamente) comparado ao controle (menos de 1%) e à dose de 2,5mJ/cm<sup>2</sup> (cerca de 3%), como visualizado na Figura 22A e B.

Em concordância com esses resultados, os fibroblastos expostos às doses de 5 e 10 mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB apresentaram morfologia achatada e espalhada, característica de células senescentes (GILCHREST *et al.*, 2013), em contraste à morfologia fusiforme dos fibroblastos controle. A dose de 2,5mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB, além de promover apenas leve aumento na proporção de células positivas para  $\beta$ -galactosidase, não induziu alterações morfológicas, demonstrando não ser efetiva em ocasionar senescência celular. Desta forma, a dose de 5mJ/cm<sup>2</sup> foi selecionada para dar continuidade às análises.

A seguir, foi investigada a expressão de p21, proteína envolvida na regulação do ciclo celular e superexpressa em células senescentes (MAO *et al*, 2015), pela técnica de *Western blot*. O resultado exposto na Figura 22C, mostra aumento evidente na expressão desta proteína 48 horas após a exposição à dose de 5mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB, em comparação ao controle.

O aumento na proporção de células positivas para  $\beta$ -galactosidase, associado à morfologia característica e aumento na expressão de p21, permite inferir que a exposição à dose de 5 mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB, induziu os fibroblastos à senescência celular, validando o modelo de fotoenvelhecimento descrito no presente trabalho.

**Figura 22 Indicadores de fotoenvelhecimento por fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVB.** (A) Imagens representativas de fibroblastos dérmicos controle (não expostos à radiação UVB) e expostos às doses de 2,5, 5 ou 10 mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB, submetidos à coloração de  $\beta$ -galactosidase 72 horas após a exposição. (B) Gráfico representando a proporção de células positivas para  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  por teste t. (C) Análise da expressão de p21 na condição controle e expostos à dose de 5 mJ/cm<sup>2</sup> de radiação UVB,  $\alpha$ -tubulina foi utilizada como referência.

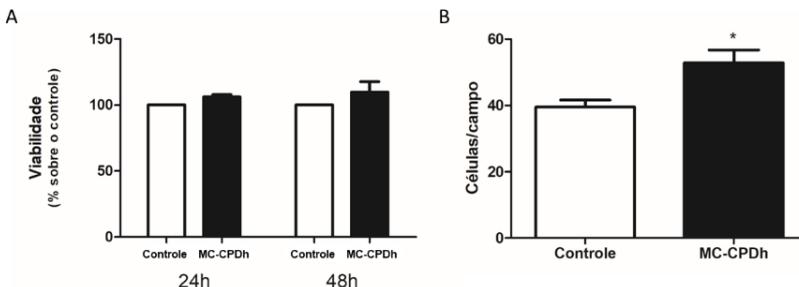


## 5.14 O MC-CPDh PROMOVE AUMENTO NO NÚMERO DE FIBROBLASTOS FOTOENVELHECIDOS

Após o estabelecimento do modelo de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos humanos por exposição à radiação UVB, foi avaliado se o MC-CPDh é capaz de prevenir esse efeito, avaliando a viabilidade celular pelo o ensaio de MTS.

Para isso, as células foram tratadas com MC-CPDh imediatamente após a indução ao fotoenvelhecimento (conforme padronizado acima) e o ensaio de MTS realizado após 24 e 48 horas. Como condição controle utilizou-se fibroblastos dérmicos humanos submetidos à mesma exposição de radiação UVB e mantidos em DMEM sem suplementação. Como observado no gráfico da Figura 23A, não houve diferença estatística entre as condições experimentais, tanto 24 quanto em 48 horas. Para complementar este resultado, o número de células foi quantificado pela contagem de núcleos corados com DAPI 48 horas após a exposição à radiação UVB e tratamento com MC-CPDh (Figura 23B). Ao contrário do ensaio anterior, os resultados demonstraram aumento significativo de 1,3 vezes no número fibroblastos após tratamento com MC-CPDh sugerindo que o MC-CPDh estimula a sobrevivência dos fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos.

**Figura 23 Efeito do MC-CPDh sobre a viabilidade de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos.** (A) Representação gráfica da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos realizada pelo ensaio de MTS 24 e 48 horas após tratamento com MC-CPDh, em relação ao controle (DMEM sem SBF) considerado 100%. (B) Gráfico da quantificação do número de células por campo 48 horas após a exposição à radiação UVB e adição do MC-CPDh. Células cultivadas com DMEM sem SBF foram consideradas controle. Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata, 10 campos foram quantificados em cada replicata. \* $p < 0,05$  por teste t.

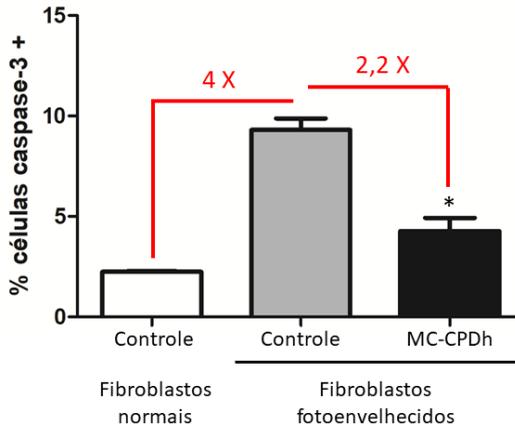


### 5.15 O MC-CPDh APRESENTA EFEITO PROTETOR SOBRE A MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS FOTOENVELHECIDOS

Para avaliar se o resultado anterior no aumento do número fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos por radiação UVB promovido pelo MC-CPDh está relacionado à diminuição na morte celular, foi realizada imunocitoquímica para caspase-3, proteína ativada durante a apoptose.

Os dados, representados na Figura 24, mostram aumento de 4 vezes na expressão de caspase-3 nos fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos (controle), que apresentaram 9,3% de células positivas para caspase-3, quando comparado aos fibroblastos normais (não expostos à radiação UVB), dos quais 2,2% das células foram positivas para caspase-3. Apesar das análises de viabilidade celular (Item 5.12 - Figura 21) não terem demonstrado efeito letal na dose de  $5\text{mJ}/\text{cm}^2$ , a imunocitoquímica para caspase-3 indica que a exposição à radiação UVB promoveu ativação de caspases e consequente aumento de células apoptóticas. Interessantemente, quando os fibroblastos foram tratados com MC-CPDh logo após a indução ao fotoenvelhecimento, houve diminuição de 2,2 vezes na proporção de células positivas para caspase-3 (4,3% no grupo tratado com MC-CPDh e 9,3% no controle). Estes resultados indicam que o MC-CPDh protege, ao menos parcialmente, contra a morte celular por apoptose induzida pela exposição à radiação UVB.

**Figura 24 Efeito protetor do MC-CPDh sobre a morte por apoptose de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos.** Gráfico representando a porcentagem de células caspase-3 positivas em fibroblastos normais e fotoenvelhecidos (não expostos e expostos à radiação UVB, respectivamente), com ou sem tratamento com MC-CPDh. Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ , por teste t.



### 5.16 O MC-CPDh AFETA A PRODUÇÃO DE MEC POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS FOTOENVELHECIDOS

Outro aspecto comum ao processo de reparo e ao fotoenvelhecimento é a alteração na produção de MEC pelos fibroblastos dérmicos. A diminuição na síntese destas proteínas está intimamente envolvida no processo de fotoenvelhecimento e, por ser o componente que garante resistência ao tecido (GILCHREST, 2013), se torna um alvo terapêutico de interesse. Por este motivo, a produção de colágeno I e fibronectina foi avaliada em fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos.

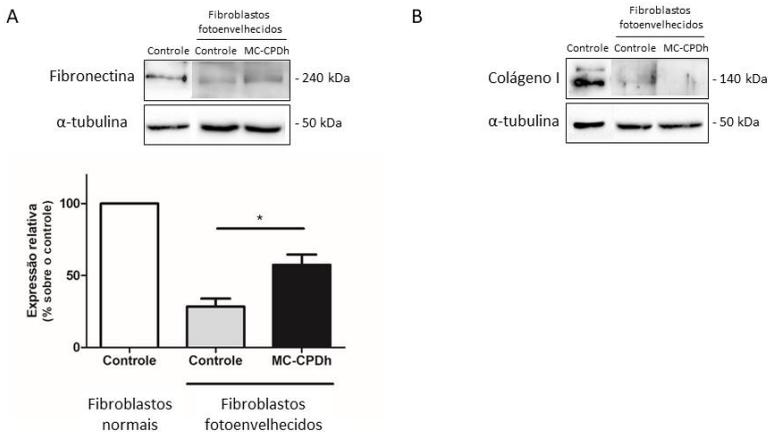
Para isso, os fibroblastos dérmicos foram tratados com MC-CPDh logo após a indução ao fotoenvelhecimento e após 48 horas, foi avaliada a produção de fibronectina e colágeno I por *Western blot*. Fibroblastos normais (não expostos à radiação UVB) foram utilizados como controle da expressão destas proteínas. Os resultados expostos na Figura 25 demonstram que a exposição à radiação UVB reduz a expressão de ambas as proteínas. Os níveis de fibronectina foram

reduzidos 3,5 vezes em fibroblastos fotoenvelhecidos em relação aos normais. Porém, o tratamento com MC-CPDh imediatamente após a indução ao fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos, reverte parcialmente este efeito, aumentando em 2 vezes a produção de fibronectina comparado às células fotoenvelhecidas e mantidas em DMEM sem SBF (Figura 25A).

Por outro lado, a expressão de colágeno I é reduzida a níveis não detectáveis por *Western blot*, após a exposição a exposição à radiação UVB. O tratamento com MC-CPDh não foi capaz de prevenir este efeito (Figura 25B).

Em conjunto, estes resultados evidenciam que o modelo de fotoenvelhecimento utilizado no presente trabalho tem forte impacto na produção de proteínas de MEC, corroborando com as alterações características do fotoenvelhecimento fisiológico da pele. Além disso, os resultados indicam que o MC-CPDh reverte parcialmente a influência negativa do fotoenvelhecimento na produção de fibronectina pelos fibroblastos, porém, sem efeito sobre a produção de colágeno tipo I.

**Figura 25 Efeito do MC-CPDh sobre a produção de MEC por fibroblastos fotoenvelhecidos.** (A) Gráfico da expressão relativa de fibronectina. As bandas foram quantificadas por densitometria e o gráfico representa a relação entre fibronectina e  $\alpha$ -tubulina. Fibroblastos normais foram considerados controle (100%) enquanto os valores obtidos nos fibroblastos fotoenvelhecidos, na ausência ou tratados com MC-CPDh, foram calculados em relação ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  por teste t, em relação ao controle. (B) Imagens representativas das bandas obtidas na análise de colágeno tipo I, demonstrando a diminuição desta proteína após a indução ao fotoenvelhecimento. Não foi possível detectar e quantificar as bandas para os fibroblastos fotoenvelhecidos.



## 6. DISCUSSÃO

As CPD são consideradas a chave central do processo de sinalização que controla o complexo sistema de morfogênese e crescimento do folículo piloso (ROMPOLAS *et al.*, 2012; YANG; COTSARELIS, 2011). Contudo, a contribuição destas células, por meio de moléculas secretadas, no reparo e proteção ao fotoenvelhecimento da pele adjacente não está completamente elucidado na literatura. O presente trabalho investigou os efeitos parácrinos das CPD, utilizando o meio condicionado destas, sobre a ativação de fibroblastos – proliferação, migração, conversão fibroblasto-miofibroblasto e produção de matriz extracelular – visando o reparo cutâneo, em modelos murinos e humanos. Tendo em vista que vesículas extracelulares vêm sendo apontadas como importantes mediadores de efeitos parácrinos em diversos sistemas (HU *et al.*, 2016; PHINNEY; PITTENGER, 2017; RAJENDRAN *et al.*, 2017), a participação destas na interação com fibroblastos também foi investigada. Além de estarem envolvidos no processo de reparo cutâneo, os fibroblastos dérmicos e sua relação com a MEC são destacados na fisiopatologia do fotoenvelhecimento (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; KIM *et al.*, 2007). Desta forma, foi estabelecido um modelo *in vitro* para o fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos por exposição à radiação UVB e avaliadas a proteção ao fotoenvelhecimento e resposta ao reparo cutâneo.

### 6.1 FGF2 FAVORECE O ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CPD DE VIBRISSA DE CAMUNDONGOS

O cultivo das CPD por explante é descrito na literatura, assim como a dificuldade de expansão destas células. As CPD possuem baixa taxa proliferativa *in vitro* e, quando cultivadas em monocamada por longas passagens, perdem seu potencial indutivo sobre o folículo piloso (KISO *et al.*, 2015; YANG; COTSARELIS, 2011). No presente estudo, foi testada a suplementação com FGF2 no isolamento e cultivo das CPD de vibrissas de camundongos, por se tratar de um potente fator mitogênico já relatado no cultivo destas células (OSADA *et al.*, 2007) e de diversas fontes de células-tronco (BIANCHI *et al.*, 2003; SOLCHAGA *et al.*, 2005; TSUTSUMI *et al.*, 2001; BITTECOURT *et al.*, 2013; BRESSAN *et al.*, 2014). Os resultados demonstraram que a suplementação de fato favoreceu o isolamento, visto pela obtenção de colônias maiores aos 5 dias de cultivo primário, e pela expansão de 3,5 vezes no número de células quando comparado ao cultivo na ausência

de FGF2. Este resultado corrobora o trabalho de Osada e colaboradores (2007), que obteve aumento de 4 vezes no número de células nos cultivos de CPD com FGF2. Neste mesmo estudo, as CPD cultivadas com o fator atingiram passagens superiores a 30, enquanto que na ausência de FGF2 as CPD não ultrapassaram a quinta passagem. A relevância da utilização de FGF2 no cultivo de CPD foi reiterada por Kiso e colaboradores (2015) que sugerem que, *in vivo*, o fator aumenta a expressão de PDGFR $\alpha$ , receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA). Por sua vez, o PDGF-AA, secretado por adipócitos subcutâneos, estimula a expressão de genes chaves na papila dérmica, os quais contribuem para a indução e manutenção da fase anágena dos folículos pilosos (KISO *et al.*, 2015).

Como amplamente descrito, o desenvolvimento e regeneração dos folículos pilosos dependem de uma complexa interação epitélio-mesenquimal, liderada pela papila dérmica através de efeitos parácrinos sobre populações epidermais residentes, principalmente, no bulge. (DRISKELL *et al.*, 2011; ROMPOLAS *et al.*, 2012). Estudos *in vivo* anteriores demonstraram que fatores secretados por papilas dérmicas em passagens baixas são capazes de induzir a regeneração de folículos pilosos, enquanto que em passagens tardias perdem esta capacidade (ZHANG *et al.*, 2016). Desse modo, no presente trabalho, as CPDm foram expandidas até a segunda passagem, na qual foi coletado o meio condicionado de três isolamentos independentes.

## 6.2 O MC-CPDm ESTIMULA O CRESCIMENTO DO PELO EM MODELO ORGANOTÍPICO

A fim de testar se o meio MC-CPDm obtido no presente trabalho possui habilidade indutora sobre o crescimento do pelo, conferida por moléculas capazes de estimular as populações epidermais e assim promover a regeneração do folículo piloso, procurou-se estabelecer formas de cultivo para acessar tais populações. Inicialmente foi utilizada a técnica de explante da região do bulge, nicho de células-tronco epidermais no folículo piloso (FUCHS, 2007). Esta técnica de cultivo foi previamente estabelecida no LACERT para o cultivo de células-tronco do folículo piloso que apresentam fenótipo de crista neural, utilizando meio de cultura específico (meio complexo) (BRESSAN *et al.*, 2014). Metodologia semelhante foi descrita na literatura para o isolamento das células-tronco epidermais do folículo piloso de ratos, utilizando diferentes substratos para adesão e meios de cultivo enriquecidos em fatores de crescimento ou meios comerciais específicos

(QUAN; ZHENG; NI, 2016; ZHANG, et al., 2012). No presente estudo, Matrigel® e colágeno tipo I foram avaliados como substrato, combinados a quatro diferentes meios de cultivo (descritos no item 4.3.1 dos Materiais e Métodos). Não foi observada a migração de células a partir do explante da região do bulge em folículos pilosos cultivados sobre Matrigel® em nenhum dos meios de cultivo testados. Este resultado pode estar relacionado com uma possível degradação das proteínas ou características do lote utilizado. Como o Matrigel® é produzido a partir de sarcoma de camundongos, não pode ser considerado uma matriz bem definida, apresentando variações na composição e concentração das suas proteínas e consequentemente influenciar nos resultados de experimentos (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010).

Cultivos realizados sobre o colágeno tipo I apresentaram grande variabilidade na quantidade de explantes apresentando migração de células e nas características fenotípicas das células que migraram em todos os meios avaliados. A população de células do bulge é heterogênea e o isolamento de uma população de células-tronco epidermais específica é desafiadora. Zhang e colaboradores (2012) descreveram o isolamento de população de células-tronco epidermais por cultivo de explante da região do bulge da vibrissa de ratos e posterior purificação e expansão baseando-se na propriedade de alta adesão em comparação à outras populações celulares que também migram. Estas células expressaram marcadores de células epidermais da camada basal (citoqueratina 14, integrina- $\alpha 6$ ), de células-tronco epiteliais (p63) e de células-tronco do bulge (citoqueratina 15), além de alto perfil proliferativo. Apesar da metodologia semelhante, no presente estudo não foi observada a expressão de marcadores de células-tronco epidermais nas células que migraram a partir dos explantes da região do bulge em nenhuma das condições e, por este motivo, não se prosseguiu com estes cultivos.

O cultivo organotípico do folículo piloso permite investigar os efeitos de substâncias na biologia do folículo piloso, bem como, promover conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na regeneração do pelo (LANGAN *et al.*, 2015). Esta abordagem foi utilizada para observar o efeito parácrino do MC-CPDm sobre o crescimento do pelo da vibrissa de camundongos e os resultados obtidos sugerem que este seja rico em fatores de crescimento e biomoléculas que estimularam o crescimento do pelo, mantendo a habilidade indutora sobre o folículo piloso. *In vivo*, a iniciação de um novo ciclo de crescimento do pelo é dependente de sinalização proveniente da papila

dérmica que estimula a ativação células quiescentes do bulge. Por sua vez, estas darão origem às células de amplificação transitória que entram em processo de proliferação, reorganização e diferenciação, levando à formação de novos pelos (BALAÑÁ; CHARREAU; LEIRÓS, 2015). Diversas biomoléculas estão envolvidas nesta comunicação entre a papila dérmica e a população de células-tronco do bulge, sendo destacados na literatura a via de Wnt/ $\beta$ -catenina, fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e inibidores de BMP (GRECO *et al.*, 2009; RISHIKAYSH *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Todavia, análises mais aprofundadas são necessárias para elucidar se o MC-CPDm realmente atuou estimulando as células-tronco do bulge e quais os mecanismos envolvidos no efeito de crescimento do pelo observado.

### 6.3 O MC-CPDm ESTIMULA A ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS

Adicionalmente às propriedades indutoras sobre o crescimento de pelos, pesquisas tem demonstrado que as CPD se mostram efetivas para o reparo cutâneo quando aplicadas associadas à substitutos dérmicos (HIGGINS *et al.*, 2017; LEIRÓS *et al.*, 2014), além de promover, *in vitro*, suporte para o crescimento de queratinócitos humanos (HILL *et al.*, 2013) e proliferação e tubulogênese de células endoteliais (BASSINO *et al.*, 2015). Dentre os diversos tipos celulares envolvidos no reparo cutâneo, os fibroblastos dérmicos compõem elementos fundamentais para o restabelecimento da homeostase e reparo da pele (SHIM *et al.*, 2013). A ativação destas células inclui a estimulação de suas propriedades proliferativas, migratórias e de síntese de proteínas de MEC (KIM *et al.*, 2007). No presente estudo foi demonstrado que o MC-CPDm estimulou a proliferação de fibroblastos e o fechamento de lesões *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos aplicando meio condicionado de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais, como do cordão umbilical (JEON *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015) e do tecido adiposo (KIM *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2013), sobre fibroblastos dérmicos. Estes estudos relacionam o efeito proliferativo do meio condicionado com diversos fatores de crescimento que são produzidos por estas células. Da mesma forma, o MC-CPDm pode ser considerado rico em fatores de crescimento que estimulam não apenas o crescimento do pelo como também a ativação de fibroblastos e consequente reparo cutâneo.

Além da proliferação e migração, os fibroblastos presentes nas bordas da lesão são estimulados a conversão em miofibroblastos que,

devido a suas características contráteis, contribuem para o fechamento da lesão, bem como, para produção de MEC (LEAVITT *et al.*, 2016; LI, *et al.*, 2015). A diferenciação fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos e sua contribuição para a contração da lesão e posterior cicatrização é um ponto controverso na literatura. Alguns pesquisadores relatam que a presença de miofibroblastos, sua atividade na contração da lesão e secreção de proteínas de matriz extracelular seja favorável e promova o fechamento mais rápido (LEE *et al.*, 2012). Por outro lado, outros estudos citam que este processo é importante para o reparo, porém quando estimulado em excesso resulta em cicatrizes menos funcionais com elevado grau de retração (LI *et al.*, 2015; XUE; JACKSON, 2015). Estes estudos ressaltam que o estímulo da proliferação e migração de fibroblastos combinado com a redução da diferenciação para miofibroblastos e aumento de MMP (envolvidas no remodelamento do colágeno) está relacionado com um processo de reparo com menor formação de cicatrizes. Neste sentido, a atividade controlada destas células é crucial para alcançar o reparo cutâneo sem fibrose excessiva.

Por outro lado, estudo conduzido por Desai e colaboradores (2014) sugere que a diferenciação para miofibroblasto não é um processo terminal, demonstrando que células tratadas com FGF2 exibiram expressão diminuída de  $\alpha$ -SMA, colágeno I e fibronectina, em adição à diminuição da adesão focal e de fibras estressoras. De forma semelhante, Rinella e colaboradores (2016) demonstraram que precursores de miofibroblastos estimulados com terapias por ondas de choque se diferenciam em células semelhantes a fibroblastos com menor capacidade contrátil e redução de expressão de  $\alpha$ -SMA e colágeno I. Estes estudos indicam que as células possuem diferentes níveis de expressão de  $\alpha$ -SMA e isso está diretamente relacionado à capacidade contrátil celular.

No presente estudo, não foi observada diferença estatística na proporção de células positivas para  $\alpha$ -SMA, porém houve redução na expressão relativa desta proteína quantificada por *Western blot*. Assim, sugere-se que, quando tratadas com MC-CPDm, as células se apresentaram em um estágio mais inicial da conversão fibroblasto-miofibroblasto. É importante ressaltar que, durante o reparo cutâneo, essa conversão fenotípica é induzida por tensões mecânicas e moléculas secretadas por células adjacentes, especialmente TGF- $\beta$ , sendo a expressão de  $\alpha$ -SMA associada a este processo de diferenciação (LEAVITT *et al.*, 2016). Desta forma, apesar de indicar que o MC-CPDm apresenta efeito antifibrótico, ensaios *in vitro* não são suficientes

para comprovar este efeito, sendo necessárias análises *in vivo* que contemplem todas estas contribuições externas.

#### 6.4 CPDm PODEM SER EXPANDIDAS IN VITRO MANTENDO CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ESFERAS

O ciclo de crescimento do pelo de camundongos e humanos apresentam muitas semelhanças, porém a formação de novos folículos pilosos naturalmente ou a partir de abordagens terapêuticas, ainda é desafiador em humanos (HIGGINS *et al.*, 2017; LEIRÓS *et al.*, 2014; RICHARDSON *et al.*, 2006). Em roedores, células dérmicas derivadas do folículo piloso são capazes de interagir com o epitélio local e formar novos folículos pilosos em regiões naturalmente sem pelos (DONG *et al.*, 2015). Entretanto, abordagens que buscam recapitular este processo em humanos têm encontrado dificuldades, sugerindo que as CPDh perdem, prematuramente, as propriedades indutivas quando cultivadas (HIGGINS, *et al.*, 2013). O comportamento agregativo das CPD é um de seus aspectos mais característicos, sendo, de certa forma, análogo à formação do condensado dérmico (placóide) na foliculogênese (OHYAMA *et al.*, 2010). Interessantemente, CPD com passagens altas, as quais não apresentam capacidade tricogênica de formar novos folículos pilosos, quando estimuladas a formar esferas e então implantadas na região subcutânea, recuperam tal capacidade (OSADA *et al.*, 2007).

Em um estudo de análise de expressão gênica global por CPDh, Higgins e colaboradores (2013) descobriram uma transição rápida e profunda na assinatura transcricional destas células, ligada à mudança de seu ambiente tridimensional para o bidimensional (monocamada) e consequente perda da capacidade indutiva sobre o folículo piloso. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a assinatura transcricional da papila dérmica intacta pode ser parcialmente restaurada pelo crescimento das CPDh em esferoides tridimensionais. Por este motivo, no presente trabalho as CPDh foram estimuladas a formar esferas antes da coleta do MC-CPDh. Conforme exposto nos resultados, houve sucesso na expansão das CPDh, que mantiveram a propriedade agregativa e formaram esferas únicas no cultivo em gota pendente. A manutenção desta característica agregativa associada a utilização das CPDh em passagem baixa (passagem 3) sugere que o meio condicionado obtido a partir destas células possa ter um perfil de moléculas secretadas semelhante à papila dérmica *in vivo*. Todavia, a

análise de proteômica do MC-CPDh é importante para confirmação e aprofundamento deste resultado.

## 6.5 O MC-CPDh ESTIMULA A ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS E PRODUÇÃO DE FIBRONECTINA

As populações de fibroblastos diferem entre os tecidos adultos exercendo diferentes funções fisiológicas (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). Além disso, a pele de fetos e indivíduos adultos apresentam diferentes respostas para o processo de reparo e, conseqüentemente, a atividade de fibroblastos (LI *et al.*, 2015; THULABANDU; CHEN; ATIT, 2017). Por esta razão, alguns ensaios anteriores realizados com a linhagem de fibroblastos embrionários murinos 3T3 e o meio condicionado da mesma espécie, foram repetidos utilizando fibroblastos dérmicos humanos e o MC-CPDh. Os resultados envolvendo a proliferação celular e o estímulo a migração e fechamento da lesão por fibroblastos dérmicos humanos foram semelhantes aos observados nos estudos com células murinas, demonstrando que o MC-CPDh estimula a proliferação e migração de fibroblastos dérmicos humanos. Estes dois mecanismos são os principais eventos que marcam a fase proliferativa do reparo cutâneo e levam à formação de uma matriz provisória, base do tecido de granulação formado nesta etapa (JEON *et al.*, 2010). Desta forma, o MC-CPDh apresenta propriedades promissoras para utilização terapêutica no reparo cutâneo, promovendo a fase proliferativa que leva ao fechamento efetivo da lesão.

O crescimento de grande parte das células humanas, que inclui os fibroblastos dérmicos, é dependente da sua adesão à MEC, em um mecanismo conhecido como dependência de ancoragem (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). A relação entre os fibroblastos e sua MEC se dá de forma bastante íntima e relevante de modo que Tracy e colaboradores (2016) citam que os fibroblastos são, de fato, definidos por sua MEC local. Na pele, a MEC além de se caracterizar como suporte estrutural para o tecido, fornece um microambiente ativo na regulação do comportamento celular, atuando como reservatório de fatores de crescimento e regulando a sua biodisponibilidade durante o reparo cutâneo (DENG *et al.*, 2017; XUE; JACKSON, 2015).

Dentre as proteínas que desempenham importante papel nesta relação fibroblasto-MEC destaca-se a fibronectina. A molécula fibrilar de fibronectina, abundante em feridas agudas, apresenta diversos domínios de ligação celular, conhecidos como sítios de promoção de crescimento, através dos quais liga-se à integrina  $\alpha_5\beta_3$  presente em

fibroblastos (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016). Esta adesão desencadeia diversos processos celulares, como a proliferação e a polarização dos fibroblastos ao longo das fibrilas de fibronectina paralelas à epiderme, o que estimula e guia a sua migração para o centro da lesão (TO; MIDWOOD, 2011). Além de interagir com vários tipos celulares envolvidos no reparo, as fibrilas de fibronectina interagem entre si e com as demais moléculas da MEC, tendo grande importância na organização e estabilidade da MEC formada durante o reparo tecidual (SOTTILE; HOCKING, 2002; XUE; JACKSON, 2015).

Em estudo *in vitro*, Sottile e colaboradores (2002) demonstraram que a polimerização de fibronectina é necessária para a deposição de colágeno I e trombosponina-1, proteína matricelular incorporada à MEC, e que a manutenção da matriz de fibronectina requer a sua polimerização contínua. Este e outros estudos comprovam que a formação de uma rede fibrilar estável de colágeno I e III, e consequente estabilização da MEC, é dependente da rede de fibronectina pré-existente (SOTTILE; HOCKING, 2002; TO; MIDWOOD, 2011). Estudos *in vivo* demonstraram que o aumento da expressão de fibronectina estimulou o reparo cutâneo em ratos diabéticos (YAN *et al.*, 2017), assim como a aplicação tópica de fibronectina acelerou a cicatrização em modelos de dermatite atópica (SEREZANI *et al.*, 2017) e em modelo de lesão de peles expostas à radiação ionizante (JOHNSON *et al.*, 2017), que apresentam reparo mais lento. Os estudos citados acima destacam a fibronectina como um componente importante e ativo, especialmente nas fases de proliferação e início do remodelamento no reparo cutâneo. No presente trabalho foi demonstrado que o MC-CPDh aumentou de forma significativa a síntese de fibronectina por fibroblastos dérmicos. Em um contexto de lesão cutânea, este aumento de fibronectina pode ter efeitos benéficos estimulando a migração de células, como fibroblastos, queratinócitos e outras células envolvidas no reparo, e consequente fechamento da lesão. Além disso, tendo em vista os efeitos da fibronectina sobre a sinalização celular e estímulo à produção de outras moléculas de MEC, como colágeno, este aumento na produção de fibronectina pode estimular também a síntese de colágeno a longo prazo. Entretanto, nas condições aplicadas neste trabalho, não foi possível demonstrar o efeito do MC-CPDh na síntese de colágeno tipo I por fibroblastos dérmicos que, após 48 horas de estímulo, apresentaram os mesmos níveis de colágeno I que o controle.

Por serem as proteínas mais abundantes na MEC da pele, os colágenos tipo I e III, sua produção e posterior remodelamento atraem a

atenção de pesquisas que buscam um reparo tecidual com aspecto e funcionalidade semelhantes à pele íntegra (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012; LEAVITT *et al*, 2016; MOORE *et al*, 2018). Esta fase de depósito e remodelamento da MEC colágena é um ponto crítico para o sucesso do reparo, pois o depósito exacerbado de colágeno e/ou uma clivagem deficiente de seus componentes pode resultar em cicatrizes hipertróficas (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012; XUE; JACKSON, 2015). Muitos dos estudos que buscam o reparo da pele sem a formação de cicatrizes, relacionam a cicatrização de tecidos adultos e de tecidos fetais, os quais tem, na fase inicial da gestação, a propriedade de regenerar o tecido sem apresentar cicatrizes (REINKE; SORG, 2012). As características que diferem este processo na pele adulta e fetal, bem como, os principais pontos que se tornam alvos experimentais na pesquisa do reparo cutâneo sem cicatrizes foram recentemente revisados por Moore e colaboradores (2018). Nesta revisão foi destacada a resposta inflamatória atenuada no reparo da pele fetal, conferindo um microambiente diferente em relação à expressão de citocinas e fatores de crescimento, o que influencia fibroblastos a depositar moléculas de MEC em um padrão regenerativo (rede) e não cicatricial (alinhado). Ainda, em comparação ao tecido adulto, o tecido fetal apresenta maior razão de colágeno III para colágeno I, além de maior atividade de MMP, conferindo remodelamento precoce da MEC colágena depositada (LEAVITT *et al*, 2016; MOORE *et al*, 2018). Estes dados reiteram que a deposição controlada de colágeno e o remodelamento eficiente são cruciais para o sucesso do reparo. O fato de não ter havido diferença na produção de colágeno I entre o controle e o MC-CPDh no presente trabalho, pode indicar um certo controle na atividade de fibroblastos dermais quanto à deposição de colágeno. Entretanto, a investigação da expressão de MMP e seus inibidores, bem como a avaliação da produção de colágeno após um período maior de exposição ao MC-CPDh seriam importantes e trariam subsídios complementares ao efeito do MC-CPDh sobre o remodelamento da MEC por fibroblastos dérmicos.

## 6.6 VE-CPDh SÃO INCORPORADAS POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS E ESTIMULAM SUA PROLIFERAÇÃO

Estudos utilizando meio condicionado de diversos tipos de células, em especial células-tronco mesenquimais, atribuem os efeitos destes à combinação de diversos fatores de crescimento e citocinas secretados pelas células. Estas biomoléculas não atuam isoladamente, ao

contrário, interagem com outras proteínas regulatórias e dificilmente um fator de crescimento isolado ou mesmo uma combinação de várias proteínas poderia reproduzir a atividade destes meios (JUNG *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2013). Mais recentemente, as vesículas extracelulares, que incluem exossomos e microvesículas, têm atraído a atenção em estudos de terapias livres de células para diversas injúrias, incluindo o reparo cutâneo (KONALA *et al.*, 2016; PHINNEY; PITTENGER, 2017; ZHAO *et al.*, 2017). Células-tronco mesenquimais de diversas fontes são protagonistas nestas pesquisas, que buscam entender a natureza e função das vesículas extracelulares derivadas destas células sobre a ativação do reparo. Em geral, estas vesículas demonstram efeitos positivos sobre a migração, proliferação e síntese de colágeno *in vitro* por fibroblastos (HU *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017), assim como, promoção da angiogênese (ZHANG *et al.*, 2015) e supressão da conversão fibroblasto-miofibroblasto e consequente diminuição da formação de cicatrizes (FANG *et al.*, 2016).

O isolamento de exossomos e microvesículas é realizado, em grande parte dos grupos de pesquisa, por ultracentrifugação do meio condicionado e a caracterização destas frações é baseada no tamanho das vesículas e em marcadores presentes nas respectivas membranas, como tetraspaninas, CD63 e CD81, presentes em exossomos (ABELS; BREAKEFIELD, 2016; PHINNEY; PITTENGER, 2017). Uma vez que esta caracterização (tamanho e marcadores) não foi realizada no presente trabalho, não é possível afirmar que o protocolo utilizado isolou especificamente exossomos, mas sim, um apanhado de vesículas extracelulares, entre as quais provavelmente estão ambas, microvesículas e exossomos. O isolamento das VE-CPDh, bem como a interação vesícula-célula, foi analisado através da observação da incorporação de VE-CPDh por fibroblastos dérmicos e investigação da atividade biológica medida em termos de proliferação celular.

A interação e internalização das vesículas extracelulares, para a entrega das biomoléculas às células receptoras, envolve mecanismos de endocitose ou a fusão direta com a membrana plasmática da célula, através de interações ligante-receptor ou lipídeos como fosfatidilserina (ABELS; BREAKEFIELD, 2016; RAJENDRAN *et al.*, 2017). A forma de interação depende do tipo celular, seu estado fisiológico e reconhecimento entre receptor e ligante, sendo determinante para o efeito funcional. A própria superfície da membrana da vesícula extracelular pode desencadear a sinalização através da interação com receptores na superfície da célula, sem a necessidade de internalização. Por outro lado, muitos casos dependem da internalização do conteúdo da

vesícula no citoplasma da célula, ou até mesmo, no núcleo (ABELS; BREAKEFIELD, 2016). Neste trabalho, utilizando VE-CPDh coradas com corante fluorescente, foi possível confirmar sua internalização por fibroblastos dérmicos. Quanto à atividade biológica, ficou evidente que as VE-CPDh exercem efeitos sobre o metabolismo de fibroblastos, que apresentaram um aumento na taxa proliferativa quando cultivados na presença das vesículas. As VE, em geral, contêm diversas proteínas, açúcares, lipídeos e uma variedade de material genético, como mRNA, miRNA, tendo seu conteúdo protegido de nucleases e proteases extracelulares pela membrana limitante (ABELS; BREAKEFIELD, 2016; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), o que configura uma grande vantagem na utilização das vesículas extracelulares.

Contudo, quando comparado ao efeito do MC-CPDh original sobre a proliferação celular, os resultados obtidos demonstraram que o efeito das VE-CPDh é parcial, somando-se ao dos fatores solúveis presentes no sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh. As CPD são conhecidas por secretarem diversas biomoléculas que ativam a proliferação celular, principalmente de células epidermais do folículo piloso (DRISKELL *et al.*, 2014; ROMPOLAS *et al.*, 2012). Dentre estes fatores, encontram-se fatores mitogênicos comumente secretados por vários tipos celulares e já conhecidos por potencializar a proliferação de fibroblastos dérmicos (ZHANG *et al.*, 2016). Desta forma, o efeito do sobrenadante da ultracentrifugação do MC-CPDh (que contém os fatores solúveis, mas desprovido de VE) sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos já poderia ser esperado. Entretanto, ao nosso conhecimento, é a primeira vez que se demonstra o isolamento de VE-CPDh e sua atividade sobre fibroblastos dérmicos humanos. A pesquisa envolvendo exossomos é campo relativamente jovem na ciência e, especialmente no grupo de pesquisa no qual este trabalho foi realizado. A caracterização das VE e o estudo do seu mecanismo de ação são os passos seguintes para preenchimento dessas lacunas. Todavia, estes dados configuram o início de uma promissora pesquisa na aplicação terapêutica das VE-CPDh, além de levantar questionamentos sobre o papel destas vesículas na fisiologia do folículo piloso.

## 6.7 MC-CPDh EXERCE EFEITO PROTETOR SOBRE A MORTE CELULAR E PROMOVE A PRODUÇÃO DE FIBRONECTINA POR FIBROBLASTOS DÉRMICOS FOTOENVELHECIDOS

A pele humana é o órgão mais exposto à radiação ultravioleta e a recorrente exposição, em particular à radiação UVA e UVB, causa diversas alterações estruturais e fisiológicas neste tecido (BRAVO *et al.*, 2017; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Apesar de a radiação UVA ser mais abundante na superfície terrestre, a radiação UVB é mais energética e apresenta efeitos biológicos mais intensos (ZENG *et al.*, 2014). Além disso, o aumento da radiação UVB na superfície terrestre devido à destruição da camada de ozônio é uma grande ameaça ambiental à pele, aumentando o risco de danos com consequências em longo prazo como fotoenvelhecimento, fotoimunossupressão e fotocarcinogênese (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017). A exposição a doses leves e repetidas de radiação UVB gera danos ao DNA, produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias que, em conjunto, levam à senescência celular, processo fisiológico diretamente relacionado ao fotoenvelhecimento (CHAINIAUX *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2014). Além das alterações teciduais de cunho estético, estudos relatam que o fotoenvelhecimento da pele compromete o processo de reparo cutâneo, o qual pode ainda ser agravado quando combinado a comorbidades adicionais comuns à idade, como diabetes e distúrbios na coagulação sanguínea (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Os fibroblastos dérmicos desempenham importante papel em ambos os processos, o fotoenvelhecimento e o reparo cutâneo (JEON *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2014), e por este motivo torna-se importante estudar, mecanismos celulares envolvidos nestes processos em fibroblastos fotoenvelhecidos.

Consistente com outros estudos (CHEN *et al.*, 2015; MAO *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2014), os dados referentes ao estabelecimento do modelo de fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos indicaram que a exposição à dose de  $5\text{mJ}/\text{cm}^2$  de radiação UVB, induziu um estado de senescência celular. Neste modelo, o fotoenvelhecimento de fibroblastos foi evidenciado pela viabilidade celular diminuída e estabilização do crescimento celular, acompanhado de aumento na atividade de  $\beta$ -galactosidase e expressão aumentada de p21, indicando parada no ciclo celular. Outra importante característica da pele fotoenvelhecida é a desorganização da MEC, desencadeada pela síntese atenuada de colágeno aliada ao aumento de degradação (KIM *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 2014). No modelo de fotoenvelhecimento estabelecido no presente trabalho, a senescência celular foi acompanhada da redução drástica na produção de MEC, representada pela expressão diminuída de fibronectina e colágeno tipo I, o que reforça que o fotoenvelhecimento

celular foi atingido com o modelo de exposição à radiação UVB aplicado.

Tendo o modelo *in vitro* de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos estabelecido, seguiu-se para a avaliação dos efeitos do MC-CPDh sobre os processos celulares envolvidos no reparo cutâneo, bem como na proteção ao fotoenvelhecimento. As células, quando senescentes, diminuem ou até cessam o processo de proliferação, e isto é devido à parada no ciclo celular (PERMATASARI *et al.*, 2014). O efeito do MC-CPDh sobre o perfil proliferativo dos fibroblastos fotoenvelhecidos foi avaliado através do acompanhamento da viabilidade celular após 24 e 48 horas e pela contagem do total de células ao final das 48 horas de tratamento com o MC-CPDh. Os resultados indicaram que o MC-CPDh estimulou a sobrevida dos fibroblastos fotoenvelhecidos, representado pelo aumento do número total de células após 48 horas de tratamento com o MC-CPDh. Uma vez que a sobrevida está relacionada com a proteção contra morte, a apoptose foi então analisada pela avaliação da ativação de caspases. Os resultados demonstraram que os fibroblastos fotoenvelhecidos apresentaram maior proporção de células positivas para caspase-3, comparado aos fibroblastos normais, indicando que a exposição à radiação UVB resultou em aumento de células em processo de apoptose. Tal fato foi reduzido quando os fibroblastos fotoenvelhecidos foram tratados com o MC-CPDh, apresentando uma significativa diminuição na proporção de células positivas para caspase-3.

Assim como a parada no ciclo celular, a apoptose é considerada um processo de recuperação celular provocado pelos danos induzidos pela radiação UVB (ZENG *et al.*, 2014). Recentemente, estudos vêm relacionando a senescência celular e a apoptose com alterações na homeostase das proteínas celulares, também referidas como proteostase (CAVINATO *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2017). Neste contexto, a autofagia (degradação de componentes citosólicos nos lisossomos) é ativada frente à exposição à radiação UV a fim de reduzir danos oxidativos, eliminando proteínas e até organelas lesadas (ZHAO *et al.*, 2013). Em concordância, Cavinato e colaboradores (2017) referem que a autofagia é requerida para o estabelecimento do fenótipo senescente e a inibição desta via é suficiente para mudar o destino da célula para a morte por apoptose. Relacionando estas informações com o modelo de fotoenvelhecimento estabelecido neste trabalho, é possível supor que a exposição à radiação UVB, nas condições aplicadas, induziu a grande maioria das células a entrarem em estado de senescência, porém, as células incapazes de se recuperar dos danos acumulados provocados

pela radiação entraram em processo de apoptose. Contudo, o tratamento de fibroblastos fotoenvelhecidos com MC-CPDh estimulou a sobrevivência das células, exercendo efeito protetor contra a morte celular por apoptose induzida pela exposição à radiação UVB.

As características histológicas da pele fotoenvelhecida mostram alterações marcantes na composição da MEC, especialmente relacionada a redução dos precursores de colágenos fibrilares do tipo I e III somada ao aumento da degradação enzimática por ação de MMP (BUECHNER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2007). Estas alterações estão relacionadas com mudanças metabólicas nos fibroblastos dérmicos, cujo papel no remodelamento da MEC já é bem caracterizado (ZENG *et al.*, 2014). No contexto do fotoenvelhecimento, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela exposição à radiação UV tem sido apontado como responsável por tais alterações, causando o aumento na expressão e síntese de MMP-1 e redução da transcrição dos genes COL3a1 e COL1a1, consequentemente redução na síntese de colágeno I e III (BRAVO *et al.*, 2017). Esta consequência da radiação UVB sobre o metabolismo do colágeno é muito abordada na literatura, sendo o alvo de diversos estudos que buscam equilibrar o processo de produção e degradação da matriz colágena atingindo a fotoproteção e a recuperação da pele (BRAVO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2015; HUH *et al.*, 2015; PERMATASARI *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2017). Contrariando expectativas, o MC-CPDh não foi capaz de reverter a brusca diminuição de colágeno I induzida pelo fotoenvelhecimento dos fibroblastos dérmicos, não tendo sido possível quantificar a expressão de colágeno I pela técnica de *Western blot* em nenhuma das condições (controle e MC-CPDh) expostas à radiação UVB. Em um estudo abordando fotoenvelhecimento de fibroblastos, Bravo e colaboradores (2017), demonstraram que tanto a dose de radiação UVB aplicada quanto o tempo pós-exposição afetam a produção e quantificação de pró-colágeno e MMP-1. Desta forma, pode-se especular que esta análise, se realizada com maior tempo de tratamento com MC-CPDh, poderia acarretar em diferentes resultados.

Por outro lado, as informações na literatura relacionadas ao efeito do fotoenvelhecimento da pele e a síntese de fibronectina são divergentes. Alguns estudos que tratam da senescência prematura induzida pelo estresse (SIPS – do inglês *stress-induced premature senescence*) consideram que células induzidas à senescência por vários fatores estressantes, que incluem a radiação UV, expressam um perfil de genes que é associado a senescência. Dentre estes genes, a fibronectina é considerada superexpressa após a indução à senescência celular

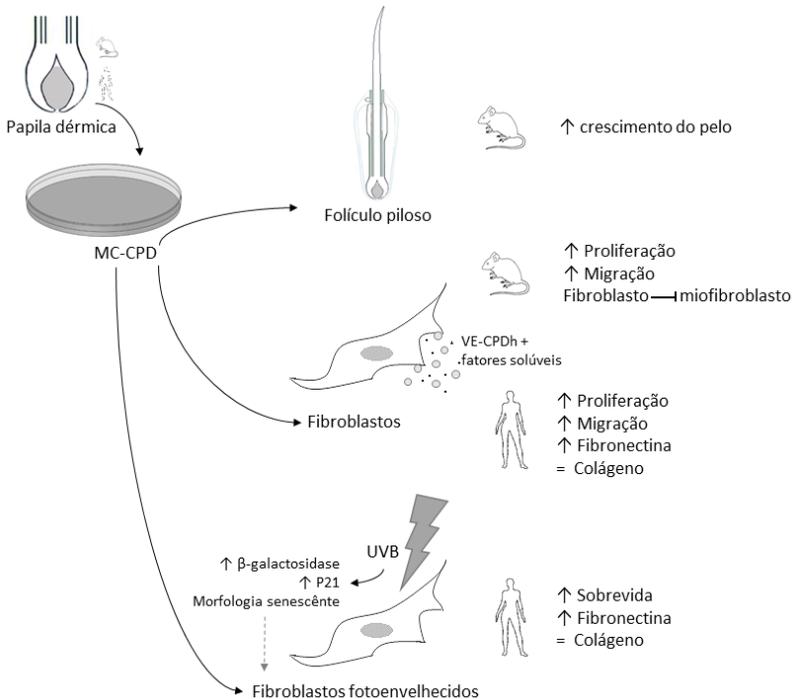
(CHAINIAUX *et al.*, 2002; DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2006; RUSZOVÁ *et al.*, 2013; TOUSSAINT; MEDRANO; ZGLINICKI, 2000), todavia a sua contribuição para a instalação deste processo não está completamente elucidada nestes trabalhos. Já Son e colaboradores (2012) demonstrou que a inibição da fragmentação da fibronectina, induzida por catepsinas ativadas pela radiação UVB, previne o fotoenvelhecimento. Enquanto Song e colaboradores (2017) relatou a diminuição da produção de fibronectina como um efeito do fotoenvelhecimento por exposição à radiação UVB, contribuindo para o estado desorganizado da derme fotoenvelhecida. Conforme exposto anteriormente, o modelo de fotoenvelhecimento estabelecido no presente trabalho corrobora este último grupo, apresentando a diminuição na expressão de fibronectina pelos fibroblastos fotoenvelhecidos, parcialmente recuperada quando tratados com o MC-CPDh.

A importância da polimerização de fibronectina no controle da organização e composição da MEC e da sinalização celular por meio de pontos de adesão com as células (SOTTILE; HOCKING, 2002) foi previamente discutido na seção que trata de fibroblastos dérmicos normais. Considerando estes aspectos, o aumento na expressão de fibronectina provocado pelo MC-CPDh em fibroblastos fotoenvelhecidos pode ser benéfico para a recuperação da integridade da pele (prejudicada pelo fotoenvelhecimento) e também para o reparo de peles fotoenvelhecidas.

Comparando os resultados obtidos em relação à produção de MEC por fibroblastos normais e fotoenvelhecidos, estes foram semelhantes ao apresentarem que o MC-CPDh influencia apenas a produção de fibronectina. Estes achados podem indicar que dentre as moléculas secretadas pelas CPDh existem elementos que atuam sobre o metabolismo desta proteína de MEC, porém são necessários estudos que contemplem a investigação específica dos fatores presentes no MC-CPDh, bem como das vias de sinalização que levam a produção de fibronectina.

Em conjunto, os resultados abordando os efeitos do MC-CPDh sobre fibroblastos fotoenvelhecidos indicam que as CPDh podem fornecer proteção contra o fotoenvelhecimento, favorecendo a sobrevivência de fibroblastos, e também beneficiar o reparo em peles fotoenvelhecidas.

**Figura 26 Esquema representativo dos efeitos parácrinos das CPD sobre o reparo cutâneo, demonstrados neste trabalho.** Os efeitos parácrinos das CPD no reparo cutâneo foram estudados através da utilização do MC-CPD (murino e humano). Os resultados sugerem que as CPD exercem efeito parácrino sobre fibroblastos dérmicos durante o processo de reparo cutâneo, promovendo a proliferação e migração celular e reduzindo a conversão fibroblasto-miofibroblasto, além de afetar a produção de MEC, estimulando a produção de fibronectina, mas sem diferença da produção de colágeno I. Em adição, VE-CPDh estão envolvidas nos efeitos observados, sendo incorporadas por fibroblastos dérmicos humanos e estimulando, parcialmente, a proliferação celular. Os fatores solúveis presentes MC-CPDh também atuam parcialmente na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos. Além disso, modelo de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos humanos com exposição à radiação UVB foi estabelecido neste trabalho, obtendo células senescentes com indicadores de fotoenvelhecimento. O MC-CPDh estimulou a sobrevivência de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos, protegendo contra a morte por apoptose, além de promover a produção de fibronectina. As ilustrações de camundongo e humano indicam os experimentos que foram realizados em cada espécie.



## 7. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados do presente trabalho permitem concluir que o isolamento das CPD é favorecido com a suplementação com FGF2 e estas mantêm a capacidade de formação de esferas após a expansão.

Através do cultivo organotípico do folículo piloso foi possível concluir que o MC-CPDm estimula o crescimento do pelo, sugerindo manutenção da habilidade indutora sobre o folículo piloso. Além disso, o MC-CPDm promove a ativação de fibroblastos murinos, estimulando a proliferação e migração celular e reduzindo a conversão fibroblasto-miofibroblasto.

De forma semelhante, o MC-CPDh promove a ativação de fibroblastos dérmicos humanos, induzindo a proliferação e migração celular, além de afetar a produção de MEC, aumentando a produção de fibronectina, mas sem diferença na produção de colágeno I.

VE-CPDh estão presentes no MC-CPDh, são incorporadas por fibroblastos dérmicos humanos. Além disso, tanto as VE-CPDh quanto os fatores solúveis presentes MC-CPDh atuam na proliferação de fibroblastos dérmicos humanos.

Por fim, o modelo de fotoenvelhecimento de fibroblastos dérmicos humanos foi alcançado com exposição à radiação UVB, obtendo células senescentes com indicadores de fotoenvelhecimento. O MC-CPDh estimulou a sobrevivência de fibroblastos dérmicos fotoenvelhecidos, protegendo contra a morte por apoptose, além de promover a produção de fibronectina.



## REFERÊNCIAS

ABELS, E. R.; BREAKEFIELD, X. O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, rna cargo selection, content, release, and uptake. **Cellular and molecular neurobiology**, 2016. v. 36, n. 3, p. 301–312.

ALONSO, L.; FUCHS, E. The hair cycle. **Journal of cell science**, 2006. v. 119, n. 3, p. 391–393.

BALANÁ, M. E.; CHARREAU, H. E.; LEIRÓS, G. J. Epidermal stem cells and skin tissue engineering in hair follicle regeneration. **World journal of stem cells**, 2015. v. 7, n. 4, p. 711–727.

BASSINO, E. *et al.* Paracrine crosstalk between human hair follicle dermal papilla cells and microvascular endothelial cells. **Experimental dermatology**, 2015. v. 24, n. 3, p. 388–390.

BIANCHI, G. *et al.* Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. **Experimental cell research**, 2003. v. 287, n. 1, p. 98–105.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature reviews molecular cell biology**, 2009. v. 10, n. 3, p. 207–217.

BRAVO, K. *et al.* Passiflora tarminiana fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of photochemistry & photobiology, b: biology**, 2017. v. 168, p. 78–88.

BRESSAN, R. B. *et al.* EGF-FGF2 stimulates the proliferation and improves the neuronal commitment of mouse epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSCs). **Experimental cell research**, 2014. v. 327, n. 1, p. 37–47.

BRUN, C. *et al.* Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. **Experimental dermatology**, 2016. v. 25, n. 2, p. 113–119.

BUECHNER, N. *et al.* Changes of MMP-1 and collagen type I $\alpha$ 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by TRX-1. **Experimental gerontology**, 2008. v. 43, n. 7, p. 633–637.

CAVINATO, M. *et al.* UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. **Journals of gerontology - series a biological sciences and medical sciences**, 2017. v. 72, n. 5, p. 632–639.

CAVINATO, M.; JANSEN-DÜRR, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental gerontology**, 2017. p. 1–5.

CHAINIAUX, F. *et al.* UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. **The international journal of biochemistry**

**& cell biology**, 2002. v. 34, n. 11, p. 1331–1339.

CHAVEZ-MUNOZ, C. *et al.* Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. **Journal of cellular biochemistry**, 2008. v. 104, n. 6, p. 2165–2173.

CHEN, L. *et al.* Rosiglitazone ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model. **Journal of dermatological science**, 2015. v. 77, n. 3, p. 173–181.

CHERMNYKH, E. S. *et al.* Dermal papilla cells induce keratinocyte tubulogenesis in culture. **Histochemistry and cell biology**, 2010. v. 133, n. 5, p. 567–576.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, 2014. v. 30, n. 1, p. 255–289.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. *et al.* Identification of potential anti-photoageing algal compounds using an in-vitro model of photoageing. **Journal of pharmacy and pharmacology**, 2006. v. 58, n. 12, p. 1577–1583.

DENG, C. *et al.* Extracellular matrix / stromal vascular fraction gel conditioned medium accelerates wound healing in a murine model. **Wound repair and regeneration**, 2017. n. doi: 10.1111/wrr.12602.

DESAI, V. D.; HSIA, H. C.; SCHWARZBAUER, J. E. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. **Plos one**, 2014. v. 9, n. 1, p. 1–12.

DONG, L. *et al.* Wnt1a maintains characteristics of dermal papilla cells that induce mouse hair regeneration in a 3D preculture system. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 2015. v. DOI: 10.10.

DRISKELL, R. R. *et al.* Hair follicle dermal papilla cells at a glance. **Journal of cell science**, 2011. v. 124, n. Pt 8, p. 1179–1182.

DRISKELL *et al.* Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, 2014. v. 504, n. 7479, p. 277–281.

EL-ANDALOUSSI, S. *et al.* Exosome-mediated delivery of sirna in vitro and in vivo. **Nature protocols**, 2012. v. 7, n. 12, p. 2112–2126.

EMING; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling and translation. **Science translational medicine**, 2014. v. 265, n. 6.

FANG, S. *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal micrnas suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- b /smad2 pathway during wound healing. **Stem cells translational medicine**, 2016. v. 5, p. 1425–1439.

FORNI, M. F.; TROMBETTA-LIMA, M.; SOGAYAR, M. C. Stem cells in embryonic skin development. **Biological research**, 2012. v. 45, n. 3, p. 215–222.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, 2007. v. 445, n. 7130, p. 834–842.

FUJIE, T. *et al.* The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells. **Journal of dermatological science**, 2001. v. 25, n. 3, p. 206–12.

GILCHREST, B. A. Photoaging. **Journal of investigative dermatology**, 2013. v. 133, p. E2–E6.

GOULD, L. *et al.* Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. **Wound repair regeneration**, 2016. v. 23, n. 1, p. 1–13.

GRECO, V. *et al.* A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. **Cell stem cell**, 2009. v. 4, n. 2, p. 155–169.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, 2008. v. 453, n. 7193, p. 314–321.

HIGGINS, C. A. *et al.* Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 2013. v. 110, p. 19679–88.

HIGGINS, C. A. *et al.* Multifaceted role of hair follicle dermal cells in bioengineered skins. **British journal of dermatology**, 2017. v. 176, n. 5, p. 1259–1269.

HILL, R. P. *et al.* Human hair follicle dermal sheath and papilla cells support keratinocyte growth in monolayer coculture. **Experimental dermatology**, 2013. v. 22, n. 3, p. 236–238.

HU, L. *et al.* Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific reports**, 2016. v. 6, n. September, p. 1–11.

HUGHES, C. S.; POSTOVIT, L. M.; LAJOIE, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, 2010. v. 10, n. 9, p. 1886–1890.

HUH, W. B. *et al.* Brown pine leaf extract and its active component trans-communic acid inhibit UVB-induced MMP-1 expression by targeting pi3k. **Plos one**, 2015. v. 10, n. 6, p. 1–18.

JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. **Stem cell research & therapy**, 2012. v. 3, n. 3, p. 20.

JAHODA, C. A. B.; HORNE, K. A.; OLIVER, R. F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. **Nature**, 1984. v. 311, n. 5986, p. 560–562.

JAHODA, C. A. B.; REYNOLDS, A. J. Hair follicle dermal sheath cells : unsung participants in wound healing. **The lancet**, 2001. v. 358, p. 1445–1448.

JEON, Y. K. *et al.* Mesenchymal stem cells interaction with skin : wound-healing effect on fibroblast cells and skin tissue. **Wound repair and regeneration**, 2010. v. 18, p. 655–661.

JOHNSON, M. B. *et al.* Topical fibronectin improves wound healing of irradiated skin. **Scientific reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–10.

JUNG, J. *et al.* Human dermal stem / progenitor cell-derived conditioned medium improves senescent human dermal fibroblasts. **International journal of molecular sciences**, 2015. v. 16, p. 19027–19039.

KIM, W.-S. *et al.* Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of dermatological science**, 2007. v. 48, n. 1, p. 15–24.

KISO, M. *et al.* Synergistic effect of PDGF and FGF2 for cell proliferation and hair inductive activity in murine vibrissal dermal papilla in vitro. **Journal of dermatological science**, 2015. v. 79, n. 2, p. 110–118.

KONALA, V. B. R. *et al.* The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. **Cytherapy**, 2016. v. 18, n. 1, p. 13–24.

KOWAL, J.; TKACH, M.; THÉRY, C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current opinion in cell biology**, 2014. v. 29, n. 1, p. 116–125.

KRETZSCHMAR, K.; WATT, F. M. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, 2014.

LANGAN, E. A. *et al.* Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives. **Experimental dermatology**, 2015. v. 24, p. 903–911.

LEAVITT, T. *et al.* Scarless wound healing: finding the right cells and signals. **Cell and tissue research**, 2016. v. 365, n. 3, p. 483–493.

LEE, D. E.; AYOUB, N.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing : novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. **Stem cell research & therapy**, 2016. v. 7, n. 37, p. DOI 10.1186/s13287-016-0303-6.

LEE, S. H. *et al.* Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. **Ann dermatol**, 2012. v. 24, n. 2, p. 136–143.

LEIRÓS, G. J. *et al.* Dermal papilla cells improve the wound healing process and generate hair bud-like structures in grafted skin substitutes using hair follicle stem cells. **Stem cells translational medicine**, 2014. v. 3, p. 1209–1219.

LI, M. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. **International wound journal**, 2015. p. doi:10.1111/iwj.12551.

MAHJOUR, S. B.; GHAFFARPASAND, F.; WANG, H. Hair follicle regeneration in skin grafts: current concepts and future perspectives. **Tissue engineering part b: reviews**, 2012. v. 18, n. 1, p. 15–23.

MAO, G. X. *et al.* Salidroside protects against premature senescence induced by ultraviolet b irradiation in human dermal fibroblasts. **International journal of cosmetic science**, 2015. v. 37, n. 3, p. 321–328.

MOORE, A. L. *et al.* Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing. **Wires: developmental biology**, 2018. p. DOI: 10.1002/wdev.309.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, 2011. v. 69, n. 3, p. 249–256.

OHYAMA, M. *et al.* The mesenchymal component of hair follicle neogenesis: background, methods and molecular characterization. **Experimental dermatology**, 2010. v. 19, n. 2, p. 89–99.

OLCZYK, P.; MENCNER, L.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **Biomed research international**, 2014. p. DOI: 10.1155/2014/747584.

OLIVER, R. The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae. **Journal of embryology and experimental morphology**, 1970. v. 23, p. 219–236.

OSADA, A. *et al.* Long-term culture of mouse vibrissal dermal papilla cells and de novo hair follicle induction. **Tissue engineering**, 2007. v. 13, n. 5, p. 975–982.

PERMATASARI, F. *et al.* Biology anti-photoaging potential of botulinum toxin type A in uUVB-induced premature senescence of human dermal fibroblasts in vitro through decreasing senescence-related proteins. **Journal of photochemistry & photobiology, b: biology**, 2014. v. 133, p. 115–123.

PHINNEY, D. G.; PITTENGER, M. F. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. **Stem cells**, 2017. v. 35, n. 4, p. 851–858.

PLIKUS, M. V *et al.* Epithelial stem cells and implications for wound repair. **Seminars in cell and developmental biology**, 2012. v. 23, n. 9, p. 946–953.

QUAN, R.; ZHENG, X.; NI, Y. Culture and characterization of rat hair follicle stem cells. **Cytotechnology**, 2016. v. 68, p. 621–628.

RAJENDRAN, R. L. *et al.* Extracellular vesicles derived from MSCs activates dermal papilla cell in vitro and promotes hair follicle conversion from telogen to anagen in mice. **Scientific reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–12.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of cell biology**, 2013. v. 200, n. 4, p. 373–383.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**, 2012. v. 49, n. 1, p. 35–43.

RICHARDSON, G. *et al.* Plasticity of rodent and human hair follicle dermal cells: implications for cell therapy and tissue engineering. **Journal of investigative dermatology symposium proceedings**, 2006. v. 10, n. 3, p. 180–183.

RICHARDSON, G. D. *et al.* Plasticity of rodent and human hair follicle dermal cells: implications for cell therapy and tissue engineering. **Journal of investigative dermatology symposium proceedings**, 2005. v. 10, n. 3, p. 180–183.

RINELLA, L. *et al.* Extracorporeal shock waves modulate myofibroblast differentiation of adipose-derived stem cells. **Wound repair and regeneration**, 2016. v. 24, n. 2, p. 275–286.

RISHIKAYSH, P. *et al.* Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. **International journal of molecular sciences**, 2014. v. 15, p. 1647–1670.

ROMPOLAS, P. *et al.* Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. **Nature**, 2012. v. 487, n. 7408, p. 496–499.

RUSZOVÁ, E. *et al.* Epilobium angustifolium extract demonstrates multiple effects on dermal fibroblasts in vitro and skin photo-protection in vivo. **General physiology and biophysics**, 2013. v. 32, p. 347–359.

SEREZANI, A. P. M. *et al.* Il-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression. **J allergy clin immunol**, 2017. v. 139, n. 1, p. 142–151.

SHIM, J. H. *et al.* Human dermal stem / progenitor cell-derived conditioned medium ameliorates ultraviolet A-induced damage of normal human dermal fibroblasts. **Plos one**, 2013. v. 8, n. 7, p. e67604.

SIKORA, E. *et al.* Impact of cellular senescence signature on ageing research. **Ageing research reviews**, 2011. v. 10, n. 1, p. 146–152.

SILVEIRA, J. E. P. S.; PEDROSO, D. M. M. UV light and skin aging. **Reviews on environmental health**, 2014. v. 29, n. 3, p. 243–254.

SOLCHAGA, L. A. *et al.* FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, 2005. v. 203, n. 2, p. 398–409.

SON, E. D. *et al.* Cathepsin g inhibitor prevents ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice via inhibition of fibronectin fragmentation. **Dermatology**, 2012. v. 224, n. 4, p. 352–360.

SONG, D. *et al.* Pal-12, a new anti-aging hexa-peptoid, inhibits UVB-induced photoaging in human dermal fibroblasts and 3D reconstructed human full skin model, keraskin-ft™. **Archives of dermatological research**, 2017. v. 309, n. 9, p. 697–707.

SOTTILE, J.; HOCKING, D. C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. **Molecular biology of the cell**, 2002. v. 13, p. 3546–3559.

SU, S.; CHEN, J. Collagen gel contraction assay. **Nature protocol exchange**, 2015. v. ISSN 2043?

TAMAMA, K.; KERPEDJIEVA, S. S. Acceleration of wound healing by multiple growth factors and cytokines secreted from multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells. **Advances in wound care**, 2012. v. 1, n. 4, p. 177–182.

THERY, C. *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants. **Current protocols in cell biology**, 2006. v. Chapter 3, n. Unit 3.22, p. 1–29.

THULABANDU, V.; CHEN, D.; ATIT, R. P. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. **Wires: developmental biology**, 2017. p. doi: 10.1002/wdev.307.

TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. **Cell**, 2016. v. 164, n. 6, p. 1226–1232.

TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis and tissue repair**, 2011. v. 4, n. 1, p. 1–17.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of tissue viability**, 2017. v. 26, p. 37–46.

TOPOUZI, H. *et al.* Methods for the isolation and 3d culture of dermal papilla cells from human hair follicles. **Experimental dermatology**, 2017. v. 26, n. 6, p. 491–496.

TOUSSAINT, O.; MEDRANO, E. E.; ZGLINICKI, T. VON. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. **Experimental gerontology**, 2000. v. 35, p. 927–945.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advances in wound care**, 2016. v. 5, n. 3, p. 119–136.

TSUTSUMI, S. *et al.* Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. **Biochemical and biophysical research communications**, 2001. v. 288, n. 2, p. 413–419.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in wound care**, 2015. v. 4, n. 3, p. 119–136.

YAN, W. *et al.* Acellular dermal matrix scaffolds coated with connective tissue growth factor accelerate diabetic wound healing by increasing fibronectin through PKC signalling pathway. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 2017. p. doi: 10.1002/term.2564.

YANG, C.; COTSARELIS, G. Review of hair follicle dermal cells. **Journal of dermatological science**, 2011. v. 57, n. 1, p. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.11.005.

ZENG, J. P. *et al.* Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: a robust model of cellular photoaging. **Journal of dermatological science**, 2014. v. 73, n. 1, p. 49–56.

ZENG, Q. *et al.* Ganoderma lucidum polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging. **Molecular medicine reports**, 2017. v. 15, n. 1, p. 111–116.

ZHANG, H. *et al.* ITRAQ-based quantitative proteomic comparison of early- and late-passage human dermal papilla cell secretome in relation to inducing hair follicle regeneration. **Plos one**, 2016. v. 11, n. 12, p. e0167474.

ZHANG, J. *et al.* Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived mscs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. 2015. v. 49, n. 13, p. DOI 10.1186/s12967-015-0417-0.

ZHANG, M. *et al.* A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model. **Wound repair and regeneration**, 2013. v. 21, n. 6, p. 897–903.

ZHANG, S. *et al.* Hair follicle stem cells derived from single rat vibrissa via organ culture reconstitute hair follicles in vivo. **Cell transplantation**, 2012. v. 21, p. 1075–1085.

ZHANG, Y. *et al.* Lef1 contributes to the differentiation of bulge stem cells by nuclear translocation and cross-talk with the notch signaling pathway. **International journal os medical sciences**, 2013. v. 10, n. 6, p. 738–746.

ZHAO, B. *et al.* Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. **Journal of molecular histology**, 2017. v. 48, n. 2, p. 121–132.

ZHAO, J. *et al.* The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. **Biomed research international**, 2013. p. doi:10.1155/2013/578479.

ZHAO, Y. *et al.* Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, 2013. v. 133, n. 6, p. 1629–1637.



## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** “Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele”.

**Pesquisador Responsável:** Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Andréa Gonçalves Trentin; Dr. Rogério Gomes.

**Pesquisadores participantes:** Priscila Barros Delben, Diana Heck, Rafaela Grecco Machado e Talita da Silva Jeremias.

**Telefones para contato:** (48) 37216905/ (48) 96728334

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), do trabalho de pesquisa “Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele”, de responsabilidade da pesquisadora Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Andréa Gonçalves Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o(a) Sr(a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone 37216905.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele. Atualmente as células tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados fragmentos de pele retirados durante as cirurgias plásticas, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células tronco da pele para compreendermos melhor o comportamento destas células.

Estudos como estes são necessários, uma vez que nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias, como por exemplo, no tratamento de pacientes com lesões cutâneas.

Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o(a) Sr(a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, entre em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o(a) Sr(a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador : \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele” e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 .



## ANEXO B - Aprovação CEUA

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00810

**Título**Protocolos experimentais utilizados pelo IACERT/UFSC que envolvem animais da espécie *Mus musculus***Data de Entrada**

21/06/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

29/11/2012

**Considerações**

Ofício nº 113/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil seiscentos e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência Biotério Setorial LACERT (BEG/CCB)

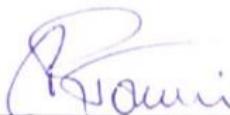
Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 28/02/2017**

Data 29/11/2012

**Parecer(es):**


**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**



## ANEXO C - Aprovação CONEP

Plataforma Brasil

aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf

Saúde  
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Principal

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

Andrea Gonçalves Trentin - Pesquisador

Cadastros Sua sessão expira em: 30m

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

**DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele  
**Pesquisador Responsável:** Andrea Gonçalves Trentin  
**Área Temática:** Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte.

**Versão:** 5  
**CAAE:** 37167014.9.0000.5355  
**Submetido em:** 01/04/2016  
**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA EDUCACAO  
 Ministério da Saúde  
 MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO  
[Ver mais >>](#)



Comprovante de Receção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_531808



## ANEXO D – Notificação de submissão de publicação

Publicação realizada em colaboração com Talita da Silva Jeremias e demais coautores, participando de alguns procedimentos experimentais e na escrita do artigo.

06/02/2018

Gmail - HACB-D-17-00196 - Submission Notification to co-author



Diana Heck &lt;dianaheck@gmail.com&gt;

---

### HACB-D-17-00196 - Submission Notification to co-author

1 mensagem

---

Histochemistry and Cell Biology (HACB) <em@editorialmanager.com> 20 de outubro de 2017 10:33  
 Responder a: "Histochemistry and Cell Biology (HACB)" <janaki.sockalingam@springer.com>  
 Para: Diana Heck <dianaheck@gmail.com>

Re: "Human hair follicles explant culture: a simple approach to study distinct cell populations"  
 Full author list: Talita da Silva Jeremias; Sabrina Dick; Diana Heck; Vanessa de Moura Sá Rocha; Andrea Gonçalves Trentin, Ph.D.

Dear M.D. Heck,

We have received the submission entitled: "Human hair follicles explant culture: a simple approach to study distinct cell populations" for possible publication in Histochemistry and Cell Biology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Andrea Gonçalves Trentin who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office  
 Histochemistry and Cell Biology

**Title:** Human hair follicles explant culture: a simple approach to study distinct cell populations

### Manuscript abstract:

In this study, we described an efficient and easy-to-implement protocol for obtaining two cell populations from whole post-plucked human hair follicles (HFs) based in their migratory characteristics. One population emigrated from the bulge region of HF and was identified as consisting of epidermal stem cells based in their morphology and expression of phenotypic markers. The other population, which emigrated from the lower region of HF, exhibited mesenchymal morphology and expressed mesenchymal phenotypic markers. Cytoplasmic  $\beta$ -catenin staining was observed in both HF-emigrated cell populations. The culture system described herein demonstrates that distinct cell populations can be obtained from human HFs using a simple protocol that facilitates the

analysis of biological parameters and preserves cell characteristics, as well as cell-to-cell interactions, making it feasible for development as a drug or cosmetic assay. A potential use in cell replacement therapy is also suggested