

2.06.01 - Morfologia/Citologia e Biologia Celular

EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME NO CRESCIMENTO DO PELO DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) C57BL/6

Maiara Marques da Silva^{1*}, Talita da Silva Jeremias², Diana Heck³, Adriane C. Fagundes³, Andréa G. Trentin⁴.

1. Estudante de IC da Fac. de Ciências Biológicas da UFSC

2. Colaboradora do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual - BEG/CCB – UFSC

3. Pesquisadoras do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual - BEG/CCB - UFSC

4. BEG/CCB – Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC / Orientadora

Resumo:

A presença de pelos é uma característica determinante dos mamíferos, sendo formado a partir do folículo piloso. Esses mini órgãos passam por um constante processo de regeneração a fim de manter a sua integridade física. Algumas doenças dermatológicas, como as alopecias, influenciam a qualidade de vida dos pacientes, podendo ser acompanhada por problemas físicos, psicológicos ou sociais. Os tratamentos disponíveis são limitados pela eficácia imprevisível e efeitos colaterais graves. Desta forma, há necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas mais eficientes. As células tronco mesenquimais (CTM) auxiliam na homeostase dos tecidos adultos e liberam um conjunto complexo de moléculas que tem influência sobre os processos biológicos, desta forma, tendo um grande potencial como alvo terapêutico. O presente trabalho buscou avaliar o efeito do secretoma de CTM da derme sobre o crescimento do pelo. Para isso, foram realizados experimentos *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 monitorados durante 21 dias. Os dados obtidos, mostram que o secretoma de CTM da derme induziu a progressão do ciclo de crescimento do folículo da fase telógena para anágena, resultando no crescimento acelerado do pelo, além de promover significativamente um aumento do comprimento e peso do pelo. Surpreendentemente, o secretoma de CTM demonstrou-se superior ao minoxidil em alguns parâmetros, sendo este um fármaco já estabelecido no mercado no tratamento da calvície e queda de cabelo. O tratamento com o secretoma de CTM atua de forma eficiente no crescimento do pelo, tendo potencial para ser utilizado como um método terapêutico alternativo para o tratamento de alopecias.

Autorização legal: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH/UFSC sob o número 1.076.626, e Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC sob número de protocolo 3836211016.

Palavras-chave: Folículo piloso, células tronco mesenquimais, crescimento do pelo.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ e FAPESC.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSC

Introdução:

A presença de pelos é uma característica determinante dos mamíferos (NALLURI; HARRIES, 2016) e possui funções que garantem proteção ao organismo. Os pelos são estruturas constituídas pelo folículo piloso (FP) um anexo epidérmico que precisa passar por um constante processo de regeneração, a fim de reparar danos, substituir células senescentes e manter a sua integridade física (FUCHS, 2007). Este processo inclui ciclos de repouso e regeneração compreendido de três estágios: fases de crescimento (anágena), regressão (catágena) e quiescência (telógena) (CAO *et al.*, 2016).

A alopecia é um grupo de doenças dermatológicas comuns que levam a perda de cabelo, sendo uma condição que influencia significativamente na qualidade de vida dos pacientes (HUNT; MCHALE, 2007). Os principais medicamentos aprovados pelos órgãos de vigilância disponíveis comercialmente para o tratamento da perda de cabelo são o Minoxidil® e a Finasterida®. Porém, o uso destes tratamentos é limitado devido à sua eficácia imprevisível e a retomada da perda de cabelo após a interrupção do tratamento. Além disso, ambos os produtos têm efeitos colaterais graves, tais como o ganho de peso, edema, dores no peito e hipogonadismo (BOISVERT *et al.*, 2017).

As células tronco mesenquimais (CTM) são células tronco adultas caracterizadas por apresentar morfologia fusiforme, aderência ao plástico, alta taxa proliferativa e capacidade de diferenciar-se nos fenótipos mesenquimais (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Grandes dificuldades são reportadas na restauração do crescimento dos pelos após lesões ou alopecias, o que pode comprometer a função protetora destas estruturas (QI; GARZA, 2014). O secretoma é definido como o conjunto complexo de moléculas liberadas por células do organismo destinadas à diversas funções biológicas (DEANS; MOSELEY, 2000). O secretoma das CTM influencia o crescimento, replicação, diferenciação e adesão celular, sendo o principal responsável pela comunicação intercelular (CHEN *et al.*, 2008), com o importante papel de manter a homeostase dos órgãos e tecidos, fazendo o suporte do nicho de células tronco e influenciando o crescimento do pelo, desta forma, o secretoma de CTM da derme surge como uma nova alternativa terapêutica na

perda de cabelo ainda não reportada na literatura. O presente trabalho busca avaliar a ação do secretoma de CTM da derme humana sobre o FP, buscando compreender seu efeito sobre o processo de regeneração e crescimento dos pelos em camundongos (*Mus musculus*).

Metodologia:

As amostras de pele da face foram obtidas em colaboração com o Hospital Universitário (HU/UFSC) mediante a prévia apresentação e assinatura do termo de consentimento pelo paciente, os fragmentos foram seccionados e dissociados, restando apenas o tecido dérmico. Foi realizada a dissociação enzimática e centrifugação do conteúdo, obtendo-se a cultura de células tronco mesenquimais mantidas em meio de cultivo celular específico e sob condições controladas. As CTM foram cultivadas em placas de 100mm de diâmetro até atingirem confluência de 90%. Após, as mesmas foram mantidas na ausência de soro bovino fetal durante 48 horas. Após esse período de condicionamento o meio foi coletado, centrifugado a 360 g durante 10 minutos e filtrado com uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,22 µm. O meio condicionado foi concentrado dez vezes utilizando o sistema *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane* de 10kDa. Foi avaliada a concentração [C] de proteínas totais contidas neste meio através do kit BCA, obtendo-se o secretoma de CTM utilizado nos experimentos *in vivo*.

Foram utilizando 48 camundongos da linhagem isogênica C57BL/6, fêmeas e machos com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram obtidos por meio de reprodução controlada no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) – UFSC. Foi realizada a pesagem dos animais no início e final do tratamento. O crescimento do pelo *in vivo* é induzido pela sua raspagem da região dorsal dos animais, assim, foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsal do animal que corresponde a 6 cm² (3 cm x 2 cm), na qual foi realizado o tratamento e análise do crescimento do pelo. Para a realização das análises os animais foram divididos (N=12) nos seguintes grupos experimentais: (1) Naïve; (2) Veículo; (3) Secretoma; (4) Minoxidil.

A aplicação dos tratamentos secretoma das CTM e veículo foi realizada a aplicação intradérmica de 100 uL em 10 pontos (10µl/ponto). Como controle positivo dos experimentos, foi utilizado o tratamento com a aplicação de 100µl de Minoxidil®, devido este produto já ser utilizado comercialmente como promotor do crescimento de pelos/cabelos. Foi realizada a aplicação 3 vezes por semana até o final do tratamento por via tópica. A solução de minoxidil® utilizada foi de 5%, sendo diluída em 10% de álcool isopropílico 10% de propileno-glicol e álcool 96° GL. O crescimento dos pelos dos camundongos foi avaliado durante 21 dias, os animais tratados foram fotografados no dia 0, 7, 14 e 21 após o procedimento experimental. Os níveis de crescimento dos pelos foram classificados por *score*, foram mensurados através da pesagem e medição do comprimento dos pelos da área tratada. Os resultados obtidos foram apresentados como média ± erro padrão da média, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram avaliados por *Teste t* independente, comparando o grupo secretoma com os demais grupos e não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas, sendo analisados conjuntamente.

Resultados e Discussão:

Os resultados obtidos com a cultura de CTM isoladas da derme humana demonstram que após o procedimento de condicionamento, mantiveram a sua morfologia fibroblastóide típica, com formato fusiforme. Além disso, não foram observadas células e fragmentos em suspensão, indicando assim que a ausência de SBF não ocasionou morte celular. Os dados obtidos mostram que o meio contém 0,5ug/uL de proteínas, determinando a aplicação de 100 µl de secretoma por animal.

Todos os grupos apresentaram um aumento do peso corporal ao longo do tratamento. Os animais do grupo naïve tiveram o menor ganho de peso (1,75g), enquanto os dos grupos tratados com minoxidil® apresentaram um ganho maior (3,54g), considerando que o ganho de peso médio de um animal adulto sem passar pelo procedimento é de 2g. A perda e a regressão do cabelo são problemas comuns na dermatologia clínica (GORDON; GORDON; TOSTI, 2011). Esta patologia é ainda mais crítica em pacientes com problemas de obesidade, estes apresentam dificuldades no processo de regeneração cutânea e dos pelos (WONG *et al.*, 2012), não tendo no mercado alternativas seguras para este público até o momento. Um exemplo é o Minoxidil®, amplamente utilizado no tratamento da queda de cabelo mas com eficácia controversa, além de possuir o efeito colateral de rápido aumento de peso que pode levar à obesidade do paciente (SAKR *et al.*, 2013). No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que há um grande aumento de peso dos animais tratados com minoxidil®.

Para avaliar a influência do tratamento sobre o crescimento do pelo, foi realizada análise da coloração da pele/presença de pelos da região tratada através de quantificação por *score*, representando o *score* 0 (pele rosada), o *score* 1 (pele acinzentada), *score* 2 (pelos curtos) e *score* 3 (pelos longos). O crescimento mais acelerado dos pelos se deu nos grupos minoxidil® e secretoma. No dia 7, os animais do grupo naïve e veículo apresentavam a pele rosada, enquanto os animais do grupo Minoxidil® e secretoma já apresentavam a pele acinzentada, indicando o crescimento do pelo. Após 14 dias de tratamento, os animais do grupo naïve e veículo apresentavam aproximadamente 20% da área tratada apresenta o *score* 0 (sem pelo), enquanto os animais do grupo Minoxidil® e secretoma, apresentam apenas 2% e 3%, respectivamente. A porcentagem das áreas representadas pelo *score* 1 e 2 foram mais homogêneas entre os grupos. No 21º dia de tratamento os animais dos grupos Minoxidil® e secretoma apresentaram crescimento total dos pelos com 100% da área tratada no *score* 3. Diferentemente, os grupos naïve e veículo apresentaram uma

heterogeneidade de pelos em crescimento. Os resultados obtidos demonstraram que o secretoma de CTM derivadas da derme promove o crescimento mais rápido dos pelos, sendo semelhante ao efeito do minoxidil®. Este crescimento acelerado indica um efeito do secretoma e do minoxidil® no ciclo do FP, ou seja, os tratamentos induzem mais rapidamente a progressão da fase telógena (repouso) para a anágena (crescimento). Diferentemente, os animais do grupo naïve e veículo tiveram um atraso no crescimento dos pelos, demonstrado pela maior área com score 0, o que indica uma retenção ou prolongamento da fase telógena.

Os dados demonstraram o efeito do secretoma de CTM sobre o peso dos pelos, tendo um aumento de 40% quando comparado aos animais naïve (0,05g) e 133% quando comparado ao grupo veículo (0,03g). Não foram observadas diferenças significativas entre o peso dos pelos nos animais do grupo minoxidil® (0,06g) e secretoma (0,07g). Para avaliar se o secretoma afeta o tamanho dos pelos, foram realizadas medidas do comprimento. A análise revelou que os animais tratados com o secretoma apresentaram um maior comprimento dos pelos, sendo este em média 7,8 mm. Os dados mostraram um aumento significativo de 40%, 14% e 10% no comprimento dos pelos dos animais tratados com secretoma em relação aos do grupo naïve (5,4 mm), veículo (6,8 mm) e minoxidil® (7,1 mm), respectivamente. Além de acelerar o crescimento dos pelos, os dados obtidos mostraram que o tratamento com o secretoma de CTM da derme também aumenta o peso e o tamanho dos pelos. No caso do aumento do peso, este pode indicar que há uma maior quantidade de pelos, ou até mesmo um aumento no comprimento e espessura dos mesmos. De fato, os resultados mostram que o comprimento dos pelos após o tratamento aumenta, inclusive quando comparado ao Minoxidil®. Foi observado o maior comprimento dos pelos em animais tratados com secretoma de CTM, com valor médio de 7,8 mm, sendo maiores em comprimento que o valor médio de 7,1 mm dos tratados com Minoxidil®. Acredita-se que a maior habilidade das CTM seja a capacidade de alterar o microambiente tecidual a partir da secreção de fatores tróficos (D'SOUZA *et al.*, 2015) e regular células integrantes do nicho via sinalização parácrina (JI *et al.*, 2017).

Conclusão:

O secretoma das células tronco mesenquimais da derme induziu a progressão da fase telógena para anágena, resultando em crescimento mais rápido do pelo, além de promover significativamente um aumento do comprimento e peso do pelo, que pode indicar uma maior quantidade de pelos. De acordo com os resultados, o efeito do secretoma das CTM da derme no crescimento do pelo foi semelhante e, até mesmo, superior ao minoxidil em algumas análises, sendo este um fármaco já estabelecido no mercado para o tratamento da calvície e queda de cabelo. Porém, o minoxidil apresenta diversos efeitos adversos em homens e mulheres o que o compromete a sua utilização. Os dados obtidos aqui, mostram que o tratamento com o secretoma atua de forma eficiente no crescimento do pelo, tendo potencial para ser utilizado como um método terapêutico alternativo para o tratamento de alopecias.

Referências Bibliográficas

- BOISVERT, W. A. et al. Hair growth-promoting effect of *Geranium sibiricum* extract in human dermal papilla cells and C57BL/6 mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 109, 2017.
- CAO, W. et al. Aging hair follicles rejuvenated by transplantation to a young subcutaneous environment. **Cell Cycle**, v. 15, n. 8, p. 1093–1098, 2016.
- CHAMBERLAIN, G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.
- CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.
- D'SOUZA, N. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 186, 2015.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875–884, 2000.
- FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 834–842, 2007.
- GORDON, K.; GORDON, K.; TOSTI, A. Alopecia: evaluation and treatment. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 4, p. 101, jul. 2011.
- HUNT, N.; MCHALE, S. The psychological impact of alopecia. **Psychologist**, v. 20, n. 6, p. 362–364, 2007.
- JI, J. et al. Aging in hair follicle stem cells and niche microenvironment. **Journal of Dermatology**, n. January, p. 1–8,

2017.

NALLURI, R.; HARRIES, M. Alopecia in general medicine. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 16, n. 1, p. 74–78, 2016.

QI, J.; GARZA, L. A. An Overview of Alopecias. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 3, p. a013615–a013615, 1 mar. 2014.

SAKR, F. M. et al. Preparation and evaluation of a multimodal minoxidil microemulsion versus minoxidil alone in the treatment of androgenic alopecia of mixed etiology: a pilot study. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 413–423, 2013.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.