

HUANNA WALESKA SOARES RODRIGUES

**EFEITO DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS- TRONCO
MESENQUIMAIS SOBRE A ELASTOGÊNESE E COLAGÊNESE DURANTE A
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) DIABÉTICOS:
ESTUDO ESTEREOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.**

TERESINA-PIAUI
2017

HUANNA WALESKA SOARES RODRIGUES

**EFEITO DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS- TRONCO
MESENQUIMAIS SOBRE A ELASTOGÊNESE E COLAGÊNESE DURANTE A
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) DIABÉTICOS:
ESTUDO ESTEREOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para
obtenção de título de Mestre em Ciência Animal. Área de
concentração: Reprodução de Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

TERESINA-PIAUI
2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

R696e Rodrigues, Huanna Waleska Soares

Efeito do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais sobre a elastogênese e colagênese durante a cicatrização cutânea de camundongos (*Mus musculus*) diabéticos: estudo estereológico e morfométrico / Huanna Waleska Soares Rodrigues – 2017.

53 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017

Orientação: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

1. Cirurgia veterinária 2. Estereologia 3. Células-tronco mesenquimais 4. Cicatrização 5. Colágeno I. Título

CDD 636.089 7

**EFEITO DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS- TRONCO
MESENQUIMAIS SOBRE A ELASTOGÊNESE E COLAGÊNESE DURANTE A
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) DIABÉTICOS:
ESTUDO ESTEREOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.**

HUANNA WALESKA SOARES RODRIGUES

Dissertação aprovada em: 24/08/2017

Banca Examinadora:



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



Profa. Dra. Betânia Souza Monteiro (Externa) / UVV



Profa. Dra. Lucilene dos Santos Silva (Interna) / Bolsista PNP/CAPES

DEDICO...

Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos. Toda Honra e Glória a DEUS!

Aos meus pais.

Agradecimentos

Este momento é extraordinário! Sou grata a Deus pelos cuidados, oportunidades e amor para comigo. Compreendo que as vitórias e dificuldades estavam nos propósitos dEle, e por meio delas, é observável o zelo do Senhor. Assim, compartilho dois versículos que me deram motivação ao longo desse tempo.

- Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar (Josué 1:9).

- O Senhor é o Deus eterno, o Criador de toda a terra. Ele não se cansa nem fica exausto, sua sabedoria é insondável. Ele fortalece ao cansado e dá grande vigor ao que está sem forças. Até os jovens se cansam e ficam exaustos, e os moços tropeçam e caem; mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam bem alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam (Isaías 40:28-31). À Deus sou eternamente grata!

À CAPES pela concessão da bolsa a nível mestrado.

À Universidade Federal do Piauí, Pós – graduação em Ciência Animal, por minha construção acadêmica.

Ao Prof. Dr Napoleão Martins Argôlo Neto pelas orientações e contribuições ao longo do mestrado, estágio à docência, pela confiança, zelo, palavras de incentivos e compromisso admirável como orientador;

À Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pela oportunidade em participar do grupo de pesquisa do NUPCELT, por compartilhar sua sabedoria e mostrar que o que aprendemos durante a vida acadêmica muito se agrega com nosso crescimento civil, pessoal e profissional.

Meu coração é agradecido à minha família, em especial, aos meus pais, Vilmar Soares Rodrigues e Maria Matilde Rodrigues da Silva, que diariamente, por meio de força e garra têm se dedicado a educar-me e tornar-me um ser de caráter, com prazer e dedicação pelos estudos e idealizador de sonhos. Este sucesso também pertence-os! Amo vocês!

Ao meu namorado, Gilberto Alves de Sousa Filho, pela paciência, amor, companheirismo e atenção. Te amo!

Ao meu irmão Vilmar Soares Rodrigues Júnior pelas preocupações e ideias.

Aos Pós –graduandos e graduandos, pela partilha de conhecimentos e experiências. Foi gratificante ter colaborado também nos seus trabalhos.

Aos funcionários do NUPCELT pela contribuição, alegria diária, e lanches (rsrs).

Aos meus amigos amados que me encorajaram em diversos momentos.

À Igreja Batista da Glória e irmãos em Cristo pelos compromissos em orações, momentos descontraídos de comunhão e aconselhamentos.

Grata a todos!

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro”.

Jeremias 29:11 (Bíblia)

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | x |
| LISTAS DE TABELAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 Morfofisiologia da Pele | 18 |
| 2.2 Cicatrização de Feridas | 19 |
| 2.3 Diabetes Mellitus | 21 |
| 2.4 Células-tronco | 22 |
| 2.5 Estereologia e Morfometria | 23 |
| MANUSCRITO | 24 |
| RESUMO | 25 |
| INTRODUÇÃO | 26 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| <i>Amostras</i> | 27 |
| <i>Processamento Histológico</i> | 28 |
| <i>Análise estereológica</i> | 29 |
| <i>Análise Morfométrica</i> | 30 |
| <i>Análise estatística</i> | 31 |
| RESULTADOS | 31 |
| DISCUSSÃO | 42 |
| CONCLUSÕES | 46 |
| REFERÊNCIAS | 47 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 50 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO | 51 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| Capítulo | | Página |
|-----------------|--|---------------|
| Figura 1. | Fotomicrografia da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético tratado com CTM. Detalhe com zoom para observação de fibras colágenas tipo 1 com birrefringência vermelha e colágeno tipo 3 com birrefringência verde e amarela. Picosirius Red, sob luz polarizada. Aumento 10x. | 32 |
| Figura 2. | Fotomicrografia da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético tratado com CTM. As fibras elásticas estão organizadas longitudinalmente à junção dermo-epidérmica (seta fina) e circunjacente à vasos sanguíneos e folículos pilosos (seta grossa). Detalhe com zoom para observação de fibras elásticas em coloração preta. Observa-se variabilidades morfológica das fibras: delgada (cabeça de seta), puntiforme (asterisco), perfil retangular curto (seta vazada) e aglomerado elásticos (círculo pontilhado). Técnica de Weigert, sob luz branca. Aumento de 10x. | 33 |
| Figura 3. | Fotomicrografia da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético, com sobreposição do sistema-teste para contagem de pontos incidentes nas fibras de colágeno tipo 1 em cor vermelha e fibras de colágeno tipo 3 cor amarela/verde. Os 48 pontos assinalados em azul foram contados ao longo da derme da pele para estimar as variáveis VCOL1 e VCOL3, de acordo com o Princípio de Cavalieri, utilizando o software Image J®. | 34 |

- Figura 4. Fotomicrografia da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético, com sobreposição do sistema-teste para contagem de pontos incidentes nas fibras elásticas em cor preta. Os 70 pontos assinalados em azul foram contados para estimar a variável ‘volume de fibras elásticas’ (VFE) de acordo com o Princípio de Cavalieri.. 34
- Figura 5. Fotomicrografias de áreas de cicatrização de feridas cutâneas de camundongos diabéticos com 12 dias de evolução. A: Animal do grupo controle (GCL), com reduzida deposição de colágeno tipo 3 (VCOL3), comparado ao grupo tratado com células-tronco mesenquimais autólogas (GCT). B: Animal do grupo membrana aderente de poliuretano (GME), com deposição de VCOL3 inferior ao grupo GCL C: Grupo GCT. Intensa deposição de fibras de colágeno tipo 3 (VCOL3) em comparação aos demais grupos. Picrosirius Red. Aumento de 10X. 36
- Figura 6. Fotomicrografias da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético tratado com CTM. A: Imagem original sem análise pela segmentação por *clusters* de cor. B: Fotomicrografia pela análise do *algoritmo K-mean clustering*, que expressa as classes de fibras colágenas tipo 1 em vermelho e fibras colágenas tipo 3 em amarelo. Técnica de Picrosirius Red. Aumento de 10x. Método de segmentação em cores. 37

- Figura 7. Fotomicrografias da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético tratado com CTM. A: Imagem original sem análise pela segmentação por *clusters* de cor. Observa-se variação nos tons do espectro da cor preta. B: Imagem com segmentação de cores, evidenciando fibras elásticas identificadas em único espectro da cor preta. Técnica de Weigert. Aumento de 10x. 38
- Figura 8. Fotomicrografias da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético, tratado com CTM. A e B: Análise de segmentação para fibras de colágeno tipo 1. A: Segmentação na cor branca para identificação do colágeno 1. B: Limiarização na cor azul para delimitação do perímetro do colágeno 1, realçado em vermelho. C e D: Análise de segmentação para fibras de colágeno tipo 3. C: Segmentação na cor branca para identificação do colágeno 3. D: Limiarização na cor azul para delimitação do perímetro do colágeno 3, realçado em amarelo. Método do Limiar por meio do *plugin Color Threshold* do programa *Image J*®. Picosirius Red. Aumento de 10x. 40
- Figura 9. Fotomicrografias da área de cicatrização de uma ferida cutânea de camundongo diabético tratado com CTM. A: Segmentação na cor vermelha para identificação das fibras elásticas. B: Limiarização na cor azul para delimitação do perímetro da área das fibras elásticas. Técnica de Weigert. Aumento de 10x. Método do Limiar por meio do *plugin Color Threshold* do programa *Image J*®. 41

LISTAS DE TABELAS

| Capítulo | | Página |
|-----------------|--|---------------|
| Tabela 1 | Valores médios estereológicos para as variáveis de volume para colágeno (VCOL1 e VCOL3) e fibras elásticas (VFE), na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos C57BL/6 diabéticos, (n=18), entre os diferentes grupos de tratamento. | 35 |
| Tabela 2 | Valores médios morfométricos para as variáveis de área para colágeno (ACOL1 e ACOL3) e fibras elásticas (AFE), na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos C57BL/6 diabéticos, (n=18), entre os diferentes grupos de tratamento. | 39 |

RESUMO

Introdução. Fatores exógenos, endógenos e patológicos podem interferir no processo cicatricial em humanos e animais por alterarem o equilíbrio entre a síntese, degradação e remodelamento de colágeno e fibras elásticas. O *diabetes mellitus* é uma doença metabólica progressiva que altera a elastogênese e colagênese, induzindo retardo no processo cicatricial. Evidências científicas sugerem que células-tronco mesenquimais modulem a resposta cicatricial. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito das células-tronco mesenquimais sobre a formação de fibras dérmicas no modelo murino de *diabetes mellitus*.

Material e Métodos. Secções histológicas de feridas cutâneas de camundongos diabéticos tratados topicamente com células-tronco mesenquimais autógenas, solução fisiológica e membrana de poliuretano foram processadas por histotécnica e coradas para fibras colágenas tipo 1 e 3 e fibras elásticas utilizando coloração de Picosirius Red e Weigert, respectivamente. As imagens obtidas foram avaliadas pelo método de Estereologia e Princípio de Cavalieri para obtenção de dados quantitativos em três dimensões 3D, representados pelo volume das fibras dérmicas e, complementarmente, pelo método de segmentação de cores. Foi utilizado o plugin *k-Means Clustering* e o software *Image J*[®], para quantificação da área das fibras dérmicas nas feridas cutâneas após os tratamentos dermatológicos propostos.

Resultados. Foram obtidas e analisadas 90 imagens. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,01$) entre o volume e área de fibras colágenas tipo 1, entre os animais tratados, sendo identificadas diferenças significativas ($p < 0,01$) apenas para os volumes e áreas do colágeno tipo 3. Contrariamente, os animais tratados apresentaram médias inferiores ($p < 0,01$) para o volume e área de fibras elásticas, quando comparados ao grupo controle.

Discussão. A preponderância de colágeno imaturo tipo 3 nas feridas cutâneas dos animais tratados com células-tronco, em comparação aos demais tratamentos, indica colagênese ativa e, conseqüentemente, maior atividade fibroblástica, provavelmente induzida pelas células-tronco. Diametralmente, a menor identificação de fibras elásticas nos fragmentos de pele tratados com células-tronco, comparado aos demais tratamentos, sugere que a terapia celular não contribuiu satisfatoriamente para a elastogênese. Relatos anteriores já sugeriram que células-tronco mesenquimais podem induzir diminuição da síntese de elastina e acredita-se que talvez tal situação possa ter ocorrido no presente estudo.

Conclusão. As células-tronco mesenquimais autógenas induziram aumento da formação de fibras colágenas em camundongos diabéticos, em detrimento da formação de fibras elásticas, sugerindo colagênese precoce ativa nas primeiras duas semanas do processo cicatricial.

Palavras-chave: Estereologia, células-tronco mesenquimais, cicatrização, colágeno.

ABSTRACT

Introduction. Exogenous, endogenous and pathological factors can interfere in the cicatricial process in humans and animals by altering the balance between the synthesis, degradation and remodeling of collagen and elastic fibers. Diabetes mellitus is a progressive metabolic disease that alters the elastogenesis and collagenesis, inducing delay in the cicatricial process. Scientific evidence suggests that mesenchymal stem cells modulate the cicatricial response. Thus, the objective of this work was evaluated in the effect of mesenchymal stem cells on the formation of dermal fibers in the murine model of diabetes mellitus. **Material and methods.** Histological sections of cutaneous wounds of diabetic mice treated topically with autogenous mesenchymal stem cells, physiological solution and polyurethane membrane were processed by histotechnique and stained for type 1 and 3 collagen fibers and elastic fibers using Picrosirius Red and Weigert staining, respectively. The obtained images were evaluated by the method of Stereology and Cavalieri's Principle to obtain quantitative data in three 3D dimensions, represented by the volume of the dermal fibers and, in addition, by the color segmentation method. The plug-in k-Means Clustering plug-in and Image J® software were used to quantify the area of the dermal fibers in the cutaneous wounds after the proposed dermatological treatments. **Results.** A total of 90 images were obtained and analyzed. No differences statistically significant ($p > 0.01$) were observed between the volume and area of collagen fibers type 1 between the treated animals. Significant differences ($p < 0.01$) were only identified for the volumes and areas of collagen fibers type 3. The treated animals presented lower means ($p < 0.01$) for the volume and area of elastic fibers when compared to the control group. **Discussion.** The preponderance of immature collagen type 3 in the cutaneous wounds of animals treated with stem cells, in comparison to the other treatments, indicates active collagenase and, consequently, greater fibroblast activity, probably induced by stem cells. Diametrically, the lower identification of elastic fibers in skin fragments treated with stem cells, compared to the other treatments, suggests that cell therapy did not contribute satisfactorily to the elastogenesis. Previous reports have suggested that mesenchymal stem cells may induce decreased elastin synthesis and it is believed that perhaps such a situation may have occurred in the present study. **Conclusion.** The autologous mesenchymal stem cells induced an increase in the formation of collagen fibers in diabetic mice, to the detriment of elastic fiber formation, suggesting active early collagen in the first two weeks of the cicatricial process.

Key words: Stereology, mesenchymal stem cells, healing, collagen