

## Artigo Original

# Estudo histológico comparativo e controlado de fibras colágenas da pele humana após terapia celular com fibroblastos

*Comparative histological controlled study of human skin collagen fibers after cell therapy with fibroblasts*

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20157302>

### Autores:

Ariene Murari Soares de Pinho<sup>1</sup>  
 Isis Sousa Oliveira Pereira<sup>2</sup>  
 Marina Emiko Yagima Odo<sup>3</sup>  
 Lilian Piñeiro Marcolin Eça<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bióloga. Acadêmica do Instituto de Pesquisa de Células-Tronco (IPCT) – Santo André (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Biomédica. Doutoranda em nanociência e materiais avançados pela Universidade Federal do ABC – Santo André (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Médica dermatologista – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Biomédica. Diretora científica do Centro de Atualizações em Saúde (CAS) – São Paulo (SP), Brasil.

### Correspondência para:

Marina Emiko Yagima Odo  
 Rua Brigadeiro Luís Antonio, 4540  
 01402-002 – São Paulo – SP  
 E-mail: [marinaodo@gmail.com](mailto:marinaodo@gmail.com)

Data de recebimento: 28/06/2015

Data de aprovação: 20/07/2015

Trabalho realizado no Instituto de Pesquisa de Células Tronco (IPCTRON) e no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: Projeto financiado pelo Pesquisa de Células Tronco (IPCTRON) – São Paulo (SP), Brasil

Conflito de Interesses: Nenhum

### RESUMO

**Introdução:** Introdução: A derme é composta principalmente por matriz extracelular e fibroblastos, que produzem colágeno tipos I e III, e fibras elásticas.

**Objetivo:** Através de estudo clínico prospectivo, comparativo e controlado verificar se há, na pele humana sadia, aumento na produção de fibras colágenas após a injeção de fibroblastos autólogos na derme.

**Métodos:** Foram colhidos dois fragmentos de pele, na região retroauricular direita de quatro mulheres com idade entre 25 e 60 anos. Em um dos fragmentos foi feita a análise histológica com hematoxilina-eosina e picrosirius, para qualificação e quantificação de fibras colágenas (grupo controle). O outro fragmento foi submetido, em laboratório, a uma digestão enzimática para extração e cultivo de fibroblastos. Após crescimento satisfatório ( $1 \times 10^7$  células/ml) os fibroblastos cultivados foram aplicados na região retroauricular esquerda das pacientes (grupo pesquisa). Três meses após foram colhidas biopsias dessa região e também coradas com hematoxilina-eosina e picrosirius para o estudo comparativo dos dois grupos.

**Resultados:** O estudo estatístico do número de fibras colágenas nas três camadas da derme – superior, média e profunda –, comparativo entre os grupos-controle e pesquisa, mostrou que as médias e medianas observadas após a aplicação das células foram maiores do que as observadas antes da aplicação.

**Conclusão:** A injeção de fibroblastos redundou em aumento na quantidade de fibras colágenas em todas as regiões da derme, sendo maior na região profunda

**Palavras-chave:** fibroblastos; terapia celular; colágeno

### ABSTRACT

**Introduction:** The dermis is mainly composed of the extracellular matrix and fibroblasts that produce collagen types I and III, and elastic fibers.

**Objective:** To verify through a prospective, comparative controlled clinical study whether there is an increase in the production of collagen fibers in healthy human skin after the injection of autologous fibroblasts in the dermis.

**Methods:** Two skin fragments were collected from the right retro-auricular region of four women aged between 25 and 60 years. In one of the fragments, histology was carried out with Hematoxylin-Eosin and Picrosirius to qualify and quantify the collagen fibers (Control Group). A second fragment underwent enzymatic digestion in the laboratory aimed at extracting and culturing fibroblasts. After satisfactory growth ( $1 \times 10^7$  cells / ml) the cultured fibroblasts were injected in the left retro-auricular region of the patients (Study Group). Three months after biopsies were harvested from this region, they were subsequently stained with Hematoxylin-Eosin and Picrosirius for comparative study between the two groups.

**Results:** Statistical analysis of the number of collagen fibers in the three layers of the dermis – upper, middle and deep – comparing the study and control groups, showed that the mean and median observed after the injection of the cells were greater than those observed before the injection.

**Conclusion:** The injection of fibroblasts results in an increase in the amount of collagen fibers in all regions of the dermis, with the increase being greater in the deeper regions.

**Keywords:** fibroblasts; cell-and tissue-based therapy; collagen

## INTRODUÇÃO

Os fatores que desencadeiam o envelhecimento da pele podem ser intrínsecos ou cronológicos, compondo um processo natural, relacionado a fatores genéticos, encurtamento dos telômeros e ação de radicais livres;<sup>1</sup> e extrínsecos constituindo o fotoenvelhecimento, que é a ação da radiação solar sobre os fatores intrínsecos.<sup>2</sup>

Os principais sinais que caracterizam o envelhecimento na pele são o afinamento da epiderme, a diminuição do número de células da derme, a quebra das fibras colágenas,<sup>3</sup> a redução dos precursores de colágeno tipos I e III, a redução no número de fibroblastos e a hiperplasia do tecido elástico.<sup>4</sup>

A pele é o maior órgão do corpo humano, e dependendo da região, apresenta variações em sua espessura.<sup>5</sup> A derme é composta principalmente por fibroblastos – que produzem colágeno tipos I e III e fibras elásticas – e matriz extracelular. Essa camada é responsável pela tonicidade, elasticidade e firmeza da pele. Podemos dividir a derme em camadas superior, média e profunda ou inferior, estando a maior concentração de fibroblastos e fibras colágenas na região superior.<sup>6</sup>

Para justificar os conceitos explicitados em relação à derme utiliza-se a técnica histológica através de colorações como a hematoxilina-eosina (HE), que permite a visualização das fibras colágenas na cor rosa, sendo essa a mais comum e rotineira, e, para análise mais específica, e o picrossírius red, que cora o colágeno de rosa a vermelho, e é muito importante para a análise de resultados após tratamentos específicos, como o objetivo deste trabalho.<sup>7</sup>

## OBJETIVO

O objetivo deste estudo clínico prospectivo, comparativo e controlado foi verificar se, após a injeção de fibroblastos autólogos na pele da região retroauricular, ocorre aumento na produção de fibras colágenas na derme humana.

## MÉTODOS

Foram selecionadas quatro mulheres, com idades entre 25 e 60 anos, brancas, procedentes de São Paulo, Brasil, não fumantes, que desejavam submeter-se a tratamentos estéticos na face, e nelas realizadas duas biópsias de pele com *punchs* de 5mm, na região retroauricular direita. A anestesia local foi efetuada com lidocaína sem vasoconstrictor para a remoção do fragmento de pele. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Santo Amaro – Unisa, protocolo 030/2009.

Um dos fragmentos foi transportado para o laboratório de cultivo celular e o outro colocado em tubo contendo formol, e encaminhado para estudo histopatológico como material do grupo-controle. Os espécimes foram corados por HE e pelo picrossírius (corante siriusred F3BA em solução saturada de ácido pícrico – SPLABOR – SP, Brazil) para a avaliação de fibras colágenas.

### Processo de extração e cultivo de fibroblastos

Os fragmentos coletados foram lavados com PBS (Phosphate Buffer Solution – LGC® – Cotia SP, Brazil) a 1% e

PE (penicilina estreptomicina LGC® – Cotia SP, Brazil).

Os fragmentos transportados para o laboratório de cultivo celular foram transferidos para a solução enzimática DPBS e EDTA (Hyqtase– Hyclone® – Logan, Utah), nela permanecendo durante quatro horas. Em seguida, a derme foi separada mecanicamente da epiderme e dos folículos pilosos. Após a remoção da epiderme realizou-se o explante celular da derme. Para isso, os fragmentos foram transferidos para garrafas de cultura de 25cm<sup>3</sup> e incubados durante 30 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse procedimento foram adicionados 5ml de meio de cultivo contendo L-aminoácidos, sais de Earle e bicarbonato de sódio (M199–LGC® – Cotia SP, Brazil) suplementado com 10% de soro fetal bovino. O material obtido foi levado para cultivo à temperatura de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> com ar umidificado.<sup>8</sup>

As células cultivadas tiveram as primeiras trocas do meio de cultivo a cada dois dias até a expansão celular. Após esse período, o meio de cultivo foi trocado a cada quatro dias. Com a obtenção de 70% de confluência da cultura primária, as células foram tratadas com enzima tripsina 0,25% (LGC® – Cotia SP, Brazil), lavadas três vezes com PBS e centrifugadas a 1.500rpm durante cinco minutos. O *pellet* (aglomerado) de células foi ressuspensão com 1ml de M199 e 20% de soro fetal bovino, e transferido para garrafa de 75cm<sup>3</sup>, sendo essa a primeira *doubling passage* (1pd). A expansão dos fibroblastos foi feita até a terceira passagem (3pd). A última troca de meio em 3pd já em confluência de 70% dos fibroblastos foi realizada com M199 suplementado com 20% de soro autólogo.

Após a etapa de tripsinização, foi realizada a viabilidade celular e posteriormente o *pellet* de células foi ressuspensão com 4ml de PBS e dividido em 10 seringas para injeção, contendo solução de fibroblastos imersos em 0,4ml de PBS. Esse processo consumiu ao todo oito semanas, seguindo-se a etapa de injeção dessa solução na pele das pacientes.

Realizada a assepsia da região retroauricular esquerda e demais áreas, seguida do uso tópico de pomada anestésica com lidocaína a 4% (Dermomax®, Lab Ache, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos, procedeu-se à injeção dos fibroblastos, realizada com seringa de 1ml e agulha 27G1/2. Uma seringa foi utilizada para injeção na região retroauricular esquerda, considerada área do grupo pesquisa, predominantemente nas dermes média e profunda. As seringas restantes foram aplicadas nas ríntides frontais e periorais, nos sulcos nasogenianos, lábio genianos e na pele periorbital para o tratamento geral da face.

Três meses após a injeção de fibroblastos, retiraram-se com *punchs* dois fragmentos da região retroauricular esquerda (área do grupo pesquisa) na direção da linha do tragus, para confecção de lâminas histológicas, com a finalidade de comparação das fibras colágenas entre os grupos-controle e pesquisa.

Esses fragmentos foram também fixados em parafina para a confecção das lâminas histológicas e corados por HE e picrossírius.

As lâminas assim preparadas foram utilizadas para a quantificação e qualificação das fibras colágenas, sendo a

quantificação realizada por meio de fotos obtidas por uma câmera Axion Vision 4,2 REL (Carl Zeiss®) acoplada a um microscópio Axiolab 2.0 (Carl Zeiss®) e analisadas pelo software ImageLab 2000. Foram realizadas fotos para análise da derme superior, média e inferior, das lâminas-controle e pesquisa, para obtenção da média da porcentagem de colágeno presente no tecido pré e pós-infusão de fibroblastos.

Foram calculados os valores das estatísticas descritivas: média, desvio-padrão, mínimo, mediana e máximo da porcentagem de fibras colágenas nos períodos pré e pós-aplicação das células nas três regiões da derme.

Os perfis individuais da porcentagem de fibras nas regiões foram representados graficamente. Foi também construído um gráfico com os valores individuais da diferença da porcentagem nos dois períodos (pós e pré).

Para cada região da derme, foi aplicado o teste t pareado (Fisher e van Belle) para comparar as médias da porcentagem de fibras nos dois períodos. Foi considerada hipótese alternativa unilateral (média no pós maior do que no pré). Nos testes de hipótese foi fixado nível de significância de 0,05.

Para a análise qualitativa, foram comparadas as diferentes colorações em amarelo e vermelho para fibras colágenas maduras, e verde para fibras colágenas jovens das lâminas-controle e pesquisa, com o auxílio de uma câmera Axion Vision 4,2 REL (Carl Zeiss®) acoplada a um microscópio polarizado Axiolab 2.0 (Carl Zeiss®), sendo obtidas as fotos desses cortes histológicos.

**RESULTADOS**

Na terceira passagem (3pd) obteve-se a média de dez milhões de células, que foram separadas em dez seringas, contendo aproximadamente um milhão de células por seringa, uma delas aplicada na região retroauricular esquerda das pacientes.

Na tabela 1 são apresentados os valores observados de estatísticas descritivas para a porcentagem de fibras colágenas por região da derme e período, e para a diferença entre as porcentagens nos dois períodos (pós e pré). Nota-se que as

médias e medianas observadas após a aplicação das células são maiores do que as observadas antes da aplicação. As médias e medianas da diferença são da mesma magnitude nas três regiões. Observa-se também que a variabilidade das medidas (avaliada pelo desvio-padrão) é maior na região inferior

Os valores individuais e médios da porcentagem nos dois períodos nas três regiões estão representados no gráfico 1. Nota-se que, nas três regiões, os valores observados no período pós são maiores do que no pré em todos os indivíduos. Esse resultado pode também ser visualizado no gráfico 2, no qual estão representados os valores individuais e médios da diferença da porcentagem das fibras colágenas nos dois períodos (pós e pré).

O teste t pareado apontou que há diferença significativa entre as médias da porcentagem de fibras colágenas nos dois períodos, sendo a média no pós maior do que no pré, nas regiões superior (p = 0,006), média (p = 0,001) e inferior (p = 0,039).

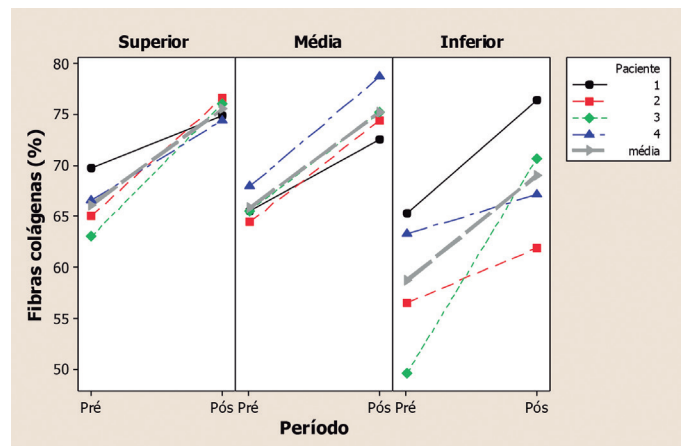
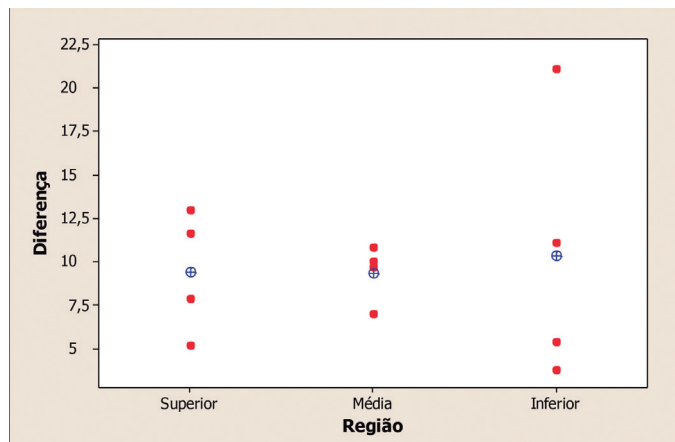


GRÁFICO 1: Perfis individuais e médios da porcentagem de fibras colágenas nas três regiões da derme

**TABELA 1: Estatísticas descritivas para a porcentagem de fibras colágenas por região da derme e período, e para a diferença entre as porcentagens nos dois períodos (pós e pré)**

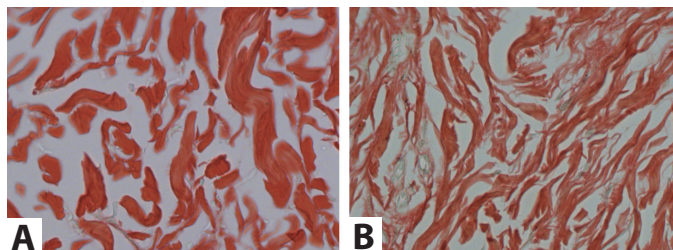
Região	Período	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Superior	Pré	4	66,1	2,8	63	65,8	69,7
	Pós	4	75,5	1	74,4	75,5	76,6
	Diferença	4	9,4	3,5	5,2	9,8	13
Média	Pré	4	65,8	1,5	64,4	65,5	67,9
	Pós	4	75,2	2,6	72,5	74,8	78,7
	Diferença	4	9,4	1,7	7	9,9	10,8
Inferior	Pré	4	58,7	7,1	49,6	59,9	65,3
	Pós	4	69	6,1	61,9	68,9	76,4
	Diferença	4	10,4	7,8	3,8	8,3	21,1



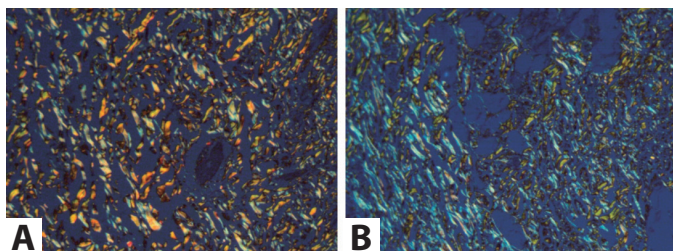
**GRÁFICO 2:** Valores individuais e médios da diferença da porcentagem das fibras colágenas nos dois períodos (pós e pré) nas três regiões da derme

A avaliação qualitativa de birrefringência da derme do grupo-controle e pesquisa está apresentada em forma de microfotografia. Foi observada nas imagens do grupo-controle uma grande quantidade de fibras colágenas maduras, coradas em amarelo avermelhado, em relação às fibras jovens, essas coradas em verde, como apresentadas na figura 1.

No grupo pesquisa foi observado aumento na quantidade de fibras colágenas jovens tipo III, coradas em verde, como mostramos nas figuras 2.



**FIGURAS 1 A E B:** Microfotografia do corte histológico pela coloração de picosirius. Grupo-controle versus grupo pesquisa, representados respectivamente pelas figuras 1 e 2. Aumento 40X



**FIGURAS 2 A E B:** A - Microfotografia polarizada (aumento 10x) de fibras colágenas maduras evidenciadas em amarelo-avermelhado com picosirius  
 B - Fibras colágenas jovens coradas em verde-azulado com picosirius (aumento 10x)

## DISCUSSÃO

A espessura da pele está relacionada principalmente com as camadas de fibras colágenas e elásticas que compõem a derme.<sup>9</sup>

O envelhecimento cutâneo<sup>10</sup> causa na pele diminuição da espessura e da tonicidade, contribuindo para o surgimento de flacidez, rugas e linhas de expressão, sendo agravado por fatores externos, como, por exemplo, a radiação solar e o tabagismo, que são responsáveis por acelerar o processo natural do envelhecimento cutâneo. Entre os diversos sinais causados por esse efeito, podemos citar a redução do número de fibroblastos e a inibição da produção e quebra das fibras colágenas.

A região superior apresenta maior quantidade de fibroblastos em comparação às demais regiões da derme e, conseqüentemente, maior quantidade de fibras colágenas,<sup>11</sup> o que foi possível comprovar neste estudo, após análise das amostras da derme do grupo-controle.

A análise das três camadas da derme dos grupos-controle e pesquisa mostrou que após a aplicação de fibroblastos houve aumento na quantidade de fibras colágenas em todas as regiões, porém o aumento dessas fibras na região profunda foi muito grande, promovendo quantidade de fibras proporcional à região superior.

Esse padrão de aumento das fibras colágenas se manteve em todas as amostras do grupo pesquisa. De acordo com os resultados de análise da birrefringência, este estudo mostra que a aplicação de fibroblastos autólogos promoveu aumento na quantidade de fibras colágenas<sup>12</sup> na derme dos pacientes, o que pôde ser observado pelo aumento no número de fibras jovens em microfotografia da imagem polarizada.

A escolha da região retroauricular dos pacientes foi devida ao fato de sofrer menos exposição aos efeitos ambientais<sup>13</sup> e não ser visível esteticamente.

Recentes estudos com fibroblastos cultivados podem identificar quais substâncias estimulam melhor os genes de ativação para produzir colágeno.<sup>14,15</sup> Os fibroblastos na pele humana *in vivo* são ativados quando recebem traumatismo de qualquer natureza, com a intenção de reparar a parede danificada, como ocorre em *peelings* químicos,<sup>16-18</sup> lasers,<sup>19,20</sup> microagulhamento com radiofrequência fracionada,<sup>21,22</sup> ultrassom focado,<sup>23,24</sup> etc. Mas não encontramos estudos que mostrassem histologicamente a região da derme em pele sadia após aplicação de fibroblastos autólogos humanos. Apesar de vários trabalhos apresentarem a ação dos fibroblastos cultivados na produção de fibras colágenas, não existem referências aos que são injetados em pele humana.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados da birrefringência, a análise das três camadas da derme do grupo pesquisa mostraram que após a aplicação de fibroblastos houve aumento na quantidade de fibras colágenas em todas elas. ●



**REFERÊNCIAS**

1. Araujo TS, Souza SO. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Scientia Plena*. 2008;4(11):1-7.
2. Moi, Regina C. Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura. 2004. [Dissertação]. Universidade de São Paulo. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto; 2004. 111p.
3. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanism Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol*. 2002; 138(11):1462-70.
4. Skin rejuvenation with photodynamic therapy: collagen and elastic fiber analysis, and clinical improvement. *Surg Cosmet Dermatol*. 2010; 2(2):87-92.
5. Rodrigues MM, Souza MS, Silva JL. Systematization of nursing care to prevent pressure-related tissue injury. *Cogitare Enferm*. 2008; 13(4):566-75.
6. Scheuplein RJ. Permeability Of The Skin. *Comprehensive Physiology*. 2011;2:456-71.
7. Manela-Azulay M, Cuzzi T, Pinheiro JCA, Azulay DR, Rangel GB. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia cosmética. *Na Bras Dermatol*. 2010;85(1):65-71.
8. Eça LPM, Pinto DG, Murari ASP, Mazzetti MPV, Odo M. Autologous Fibroblast Culture in the Repair of Aging Skin. *Dermatol Surg*. 2012;38(2):180-4.
9. Fathi-Azarbayjani A, Tan PL, Chan YY, Chan SY. Ascorbic Acid for the Safe Use of a Sunscreen Agent: Accumulation of Nano Zinc Oxide and Titanium Dioxide on the Skin. *Sci Pharm*. 2013;81(4):1141-50.
10. Oriá RB, Santana EN, Fernandes MR, Ferreira FVA, Brito GAC. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):425-34.
11. Osman SO, Selway JL, Harikumar PE, Stocker CJ, Wargent ET, Cawthorne MA, et al. A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:2-10.
12. Boss WK, Usal H, Fodor PB, Chernoff G. Autologous cultured fibroblast: protein repair system. *Annals of Plastic Surgery*. 2000;44(5): 536-42.
13. Jolivot R, Benezeth Y, Marzani F. Skin Parameter Map Retrieval from a Dedicated Multispectral Imaging System Applied to Dermatology/ Cosmetology. *Inter J Biomed Imag*. 2013;2013:978289.
14. Avantaqqiato A, Girardi A, Palmieri A, Pscali M, Carinci F. Comparison of Bio-Revitalizing Injective Products: A Study on Skin Fibroblast Cultures. *Rejuvenation Res*. 2015;18(3):270-6
15. Bygd HC, Akilbekova D, Muñoz A, Forsmark KD, Bratlie KM. Poly-L-arginine based materials as instructive substrates for fibroblast synthesis of collagen. *Biomaterials*. 2015;63:47-57.
16. Omi T, Sato S, Numano K, Kawana S. Ultrastructural changes of the skin due to chemical peeling. *J Cosmet Laser Ther*. 2010;12(1):21-4.
17. Hexsel D, Mazzuco R, Dal'Forno T, Zechmeister D. Microdermabrasion followed by a 5% retinoic acid chemical peel vs. A 5% retinoid acid chemical peel for the treatment of photoaging- a pilot study. *J Cosmet Dermatol*. 2005; 4(2):111-6.
18. Monheit GD. Medium-depth chemical peels. *Dermatol Clin*. 2001;19(4):413-25.
19. Brauer JA, Kazlouskaya V, Alabdulrazzaq H, Bae YS, Bernstein LJ, Anolik R, et al. Use of a picosecond pulse duration laser with specialized optic for treatment of facial acne scarring. *JAMA Dermatol*. 2015; 151(3): 278-84.
20. Stuzin JM, Baker TJ, Baker TM, Kligman AM. Histologic effects of the high-energy pulsed CO2 laser on photoaged facial skin. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99(7): 2036-50.
21. Lee HJ, Seo SR, Yoon MS, Song JY, Lee EY, Lee SE. Microneedle fractional radiofrequency increases epidermal hyaluronan and reverses age-related epidermal dysfunction. *Lasers Surg Med*. 2015 sep 28. doi: 10.1002/lsm.22420. [Epub ahead of print]
22. Hantash BM, Ubeid AA, Chang H, Kafi R, Renton B. Bipolar fractional radiofrequency treatment induces neoelastogenesis and neocollagenesis. *Lasers Surg Med*. 2009; 41(1): 1-9.
23. Suh DH, Choi JH, Lee SJ, Jeong KH, Song KY, Shin MK. Comparative histometric analysis of the effects of high-intensity focused ultrasound and radiofrequency on skin. *J Cosmet Laser Ther*. 2015; 17(5): 230-6.
24. MacGregor JL, Tanzi EL. Microfocused ultrasound for skin tightening. *Semin Cutan Med Surg*. 2013; 32(1):18-25.