

VANINA MONIQUE TUCCI-VIEGAS

**CGRP E SP EM CULTURA DE FIBROBLASTOS DE
QUELOIDE**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2011

VANINA MONIQUE TUCCI-VIEGAS

**CGRP E SP EM CULTURA DE FIBROBLASTOS DE
QUELOIDE**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Hochman

Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Pereira de França

SÃO PAULO

2011

Tucci-Viegas, Vanina Monique
CGRP e SP em Cultura de Fibroblastos de Queloide/ Vanina Monique
Tucci-Viegas --São Paulo, 2011.
XXI, 153f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-
Graduação em Cirurgia Plástica
Título em inglês: CGRP and SP in Cultured Keloid Fibroblasts.

1. Queloide 2. Fibroblastos 3. Peptídeo Relacionado com Gene de
Calcitonina 4. Substância P 5. Apoptose 6. Proteína p53

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
PLÁSTICA**

COORDENADOR:

Prof.: Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais.
Palavras são inadequadas
e insuficientes para expressar a minha gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células, pela oportunidade, pela transmissão do conhecimento na área de pesquisa que muito embasou minha formação, e por contribuir para o meu crescimento científico.

Ao **PROF. DR. BERNARDO HOCHMAN**, Professor Afiliado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp, Professor Orientador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp, meu orientador, essa pessoa tão especial, que me “escolheu a dedo” no início dessa jornada, meu agradecimento pessoal pela oportunidade, carinho, orientação, paciência e confiança em mim depositada. Obrigada por contribuir para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao **PROF. DR. JERÔNIMO PEREIRA DE FRANÇA**, Professor Adjunto de Biofísica do Departamento de Ciências Biológicas - DCB da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, meu coorientador, pelo imenso carinho, por ter me orientado de forma tão pessoal, tão rara. Por todos os ensinamentos preciosos em todos os momentos, em cultura de células e ciência que fazem de mim hoje, com certeza, uma pesquisadora mais completa. Pela confiança em mim depositada, e pelo apoio incondicional. Pela imensa contribuição ao meu crescimento científico e pessoal. Pesquisar e aprender ao seu lado é sempre um privilégio.

Ao **PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**. Professor Adjunto Livre-Docente e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp, pela atenção, apoio e incentivo.

À **PROFA. DRA. HELENA BONCIANI NADER**. Professora Titular e Chefe do Departamento de Bioquímica da Unifesp pela colaboração e oportunidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal e Citômetro de Fluxo, essenciais para realização desse trabalho.

À **CAROLINE VITO ROMERA** e **ELIZABETH NAOMI KANASHIRO**, pelo apoio técnico do Microscópio de Fluorescência Confocal e Citômetro de Fluxo.

À **DRA. MARIA APARECIDA DALBONI**, PhD, Supervisora do Laboratório de Uremia da Disciplina de Nefrologia da Unifesp, pelo apoio técnico, orientação e inestimável ajuda no uso do Citômetro de Fluxo.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA**, e **SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, pela amizade, atenção, apoio pessoal e administrativo. Extremamente prestativas, sempre fazem um pouco mais e iluminam nosso dia. Levo vocês dentro do meu coração.

À enfermeira **MÁRCIA FONSI ELBREDER**, Mestre e Doutora em Enfermagem pela Unifesp, à Técnica em Enfermagem **ELENA RODRIGUES DA SILVA**, às demais enfermeiras, técnicas e auxiliares e à assistente administrativa **CLAUDETE OLIVEIRA SILVA**, assim como aos médicos residentes da Casa da Cirurgia Plástica da Unifesp, pela atenção, dedicação e apoio, resultando em imensa ajuda quando da coleta dos exemplares de queoide no início do projeto. Só não cito todos os nomes aqui porque deixaria de fora pessoas importantes. Todos sempre me ajudaram indistintamente! Muito obrigada!

Aos amigos do laboratório de Cultura de Células, **ANTONIO CARLOS ALOISE** (Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp – PPGCP/Unifesp), **CELESTINO PRÓSPERO** (Mestre em Ciências pelo PPGCP/Unifesp), **GABRIELA SOARES SILVA BRITO** (Mestre em Ciências pelo PPGCP/Unifesp), **JORGE MANUEL** (Mestre em Ciências pelo PPGCP/Unifesp), **MICHELLE ZAMPIERI IPOLITO** (aluna de doutorado do PPG/Unifesp), **RAQUEL CUNSKIS CHIOCHETTE** (estagiária do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp), **SILVANA GAIBA** (aluna de doutorado do PPGCP/Unifesp), pela colaboração ao longo do trabalho, sugestões e auxílio nos protocolos experimentais, e por tantas outras coisas que passamos juntos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Acima de tudo pelo carinho e amizade demonstrado diariamente dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp – PPGCP/ Unifesp que também contribuíram para a realização deste trabalho: **ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA** (Mestre em Ciências pelo PPGCP/Unifesp), pela colaboração no laboratório, **SORAIA FERRARA** (Mestre em Ciências pelo PPGCP/Unifesp), pelo apoio no final, e amigos externos que também contribuíram: **ESTEVÃO GABRIEL DIAS ABREU**, pela ajuda na digitação de tabelas e **LIDIA YSHII** (Mestre em Farmacologia pela USP), pela ajuda nos cálculos estatísticos.

A todos os professores da Universidade Federal de São Paulo, pelos constantes ensinamentos e pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, em especial àqueles que fazem o Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp por conceder a bolsa de estudos da CAPES.

*A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original.*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	6
4. MÉTODOS	24
5. RESULTADOS.....	51
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
NORMAS ADOTADAS.....	106
ABSTRACT	107
APÊNDICES.....	108
Apêndice 1	108
Apêndice 2	110
Apêndice 3	113
Apêndice 4	115
Apêndice 5 – Artigo Publicado	116
Apêndice 6 – Artigo Publicado	118
Apêndice 7 – Artigo Submetido a Publicação	119
Apêndice 8	120
Apêndice 9	121
Apêndice 10	124
Apêndice 11	130
FONTES CONSULTADAS	132

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Região corporal doadora de amostras de queiloide: região torácica anterior delimitada pelos limites súpero-inferior (a) x (xi) e limites latero-lateral 25
- FIGURA 2** – Excisão do queiloide em monobloco. (a) – Marcação no paciente da região de excisão do queiloide, de forma fusiforme justaqueloideana, incluindo fragmentos de pele adjacente nas extremidades. (b-c) – Queiloide excisado. 28
- FIGURA 3** – Obtenção das amostras das diferentes regiões do queiloide utilizando *punch* circular de 3 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade. (a) – Retirada de fragmentos da pele adjacente ao queiloide. (b) – Retirada do primeiro fragmento da região periférica, sendo o *punch* posicionado em uma das extremidades longitudinais. (c) – Detalhe do fragmento obtido da região periférica do queiloide. (d) – Retirada do primeiro fragmento da região central do queiloide. (e) – Aspecto final da peça cirúrgica mostrando os orifícios após a remoção dos fragmentos. Em vermelho, orifícios da região central do queiloide. Em azul, da região periférica, e em verde, da pele adjacente ao queiloide. (f) – Fragmentos obtidos da região central do queiloide (KC), região periférica (KP) e pele adjacente (KS). 30
- FIGURA 4** – Citometria de fluxo. (A) Análise do ciclo celular de um dos experimentos do grupo queiloide controle (sem adição de neuropeptídeos), mostrando os diferentes perfis entre os grupos. M1: células apoptóticas; M2: fase G0-G1; M3: fases M/S. Fibroblastos provenientes de: (a) pele adjacente ao queiloide; (b) região central; (c) região periférica. (B) Distribuição quantitativa do ciclo celular. Dados analisados 54

utilizando-se one-way Anova, seguido por Newman-Keuls (nível de significância $p < 0,05$). (B e C) Os valores representam a média \pm erro padrão de pelo menos quatro diferentes experimentos.

FIGURA 5 – Citometria de fluxo - Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queloides Subgrupo Controle. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados de três experimentos. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (nível de significância: $p < 0,05$) *: $p < 0,05$. 56

FIGURA 6 – Citometria de Fluxo - Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queloides. (A) Células viáveis. (B) Células em apoptose. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados de três experimentos. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$) *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. 57

FIGURA 7 – Atividade celular por MTT sob ação dos neuropeptídeos após 24 e 48 horas. Grupo Cicatriz (CP, CC) e Grupo Queloides (QPele, QC, QPF). Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (C) (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células, semeadas em triplicata. (A) e (B) ilustram dois experimentos isolados e semelhantes. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. 59

FIGURA 8 – Atividade Celular por MTT Sob Ação dos Neuropeptídeos ao Longo do Tempo. Grupo Queloides. (A) QPele. (B) QC. (C) QPF. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro 60

padrão de células de 3 pacientes diferentes (n=3), semeadas em triplicata.

FIGURA 9 – Atividade Celular por MTT ao Longo do Tempo. Grupo Queloides x 3T3 (A) QPele. (B) QPF1. (C) QPF2. (D) 3T3. (E) QPele x QPF. (F) QPele x 3T3. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-D) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (E-F, sem marcação nos gráficos) (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente (n=1), semeadas em triplicata.

62

FIGURA 10 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Queloides – QPele e QC. (A) QPele. (B) QC1. (C) QC2. (D) QC1 x QC2. (E) QPele x QC. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-C) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (D-E) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente (n=1) em cada curva, semeadas em triplicata. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos.

64

FIGURA 11 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Queloides – QPele e QPF. (A) QPele. (B) QPF1. (C) QPF2. (D) QPF1 x QPF2. (E) QPele x QPF. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-C) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (D-E) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente (n=1) em cada curva, semeadas em triplicata. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos.

66

FIGURA 12 – Espectrofotometria de luminescência com HRP. Expressão de p53 em fibroblastos de queiloide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos. (A) Experimento completo. (B) Controle. (C) Controle x CGRP. (C) Controle x SP. (D) Controle x CGRP+SP. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam diferentes pacientes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. RLU: Unidades Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni.

68

FIGURA 13 – Espectrofotometria. Expressão de p53 em fibroblastos de queiloide e cicatriz normotrófica nos subgrupos controle. (A) Espectrofotometria de luminescência com HRP. (B) Espectrofotometria de fluorescência com TRITC. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento por gráfico (nível de significância: $p < 0,05$ - sem marcação nos gráficos). Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. RLU: Unidades Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (nível de significância: $p < 0,05$).

69

FIGURA 14 – Espectrofotometria de fluorescência com TRITC. Expressão de caspase-3 em fibroblastos de queiloide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos. (A) Controle. (B) Controle x CGRP. (C) Controle x SP. (D) Controle x CGRP+SP. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os

71

fibroblastos. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. RLU: Unidades Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$).

FIGURA 15 – Microscopia confocal. Fibroblastos cultivados da pele adjacente de queuloide. (A) Núcleos celulares marcados com DAPI (azul); (B) Filamentos de actina marcados com faloidina / AlexaFluor-488 (verde); (C) Imagens sobrepostas. 73

FIGURA 16 – Microscopia confocal. Fibroblastos cultivados da pele adjacente de queuloide. (A) Mitocôndrias marcadas com Mitotracker (verde); (B) Núcleos celulares marcados com DAPI (azul); (C) Filamentos de actina marcados com faloidina / AlexaFluor-594 (vermelho); (D) Imagens sobrepostas. 74

FIGURA 17 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3 mostrando as células aderidas, em baixa confluência, mas com distribuição homogênea na garrafa. Barra: 100 μm . Obj. 4x + 1,5 x. Aumento 60x. 121

FIGURA 18 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3 mostrando as células aderidas, em baixa confluência, mas com distribuição homogênea na garrafa. Barra: 30 μm . Obj. 10x + 1,5x. Aumento 150x. 122

FIGURA 19 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3. Células aderidas, em baixa confluência e com morfologia típica. Barra: 20 μm . Obj. 20x + 1,5x. Aumento 300x. 122

FIGURA 20 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3. Células aderidas apresentando morfologia típica. Barra: 123

10 μ m. Obj. 40x + 1,5x. Aumento 600x.

FIGURA 21 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Quelóide. QPele. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada. 125

FIGURA 22 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Quelóide. QC. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada. 126

FIGURA 23 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Quelóide. QPF. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada. 127

FIGURA 24 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Cicatriz. CP. A - Controle; B –CGRP; C –SP; D – CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em 128

função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

FIGURA 25 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Cicatriz. CC. A - Controle; B –CGRP; C –SP; D – CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada. 129

FIGURA 26 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Cicatriz. (A) CP. (B) CC. (C) CP x CC. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-B) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (C) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente ($n=1$) em cada gráfico, semeadas em triplicata. 130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
alfa-MSH	<i>alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone</i> – Hormônio alfa Estimulador de Melanócitos
APAF-1	<i>Apoptosis Protease Activating Factor-1</i> - Fator Ativador de Proteases Pró-Apoptóticas-1
baFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> - Fator de Crescimento de Fibroblastos, forma básica
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina Sérica Bovina
CAI	<i>Cutaneous Allergic Inflammation</i> – Inflamação Alérgica Cutânea
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	(4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i> , Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> - Fator de Crescimento

	Epidérmico
<i>et al.</i>	e outros
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> - Fator de Crescimento de Fibroblastos
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> – Isotiocianato de Fluoresceína
Fura-2/AM	Indicador de Ca ²⁺ intracelular-acetoxi-metil éster
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	Ácido de (N-I-2-hidroxietil)piperazina-2-etanosulfônico
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid</i> – Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina N'-2-Etano Sulfônico
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Peroxidase de Raiz-Forte
mm	milímetro
MTT	<i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide</i> 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NEP	<i>Neutral Endopeptidase</i> - Endopeptidase Neutra
NK	Neurocinina
NK-1R	Receptor de Neurocinina-1
NPY	Neuropeptídeo Y
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PGE(2)	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT-A	Preprotaquiquinina-A
RLU	<i>Relative Light Units</i> – Unidades Relativas de Luz
SP	Substância P

TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate</i> - Isotiocianato de Tetrametilrodamina-5-(e 6)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling</i> Marcação por dUTP das extremidades cortadas, mediada por desoxinucleotidil transferase terminal
Versene	PBS com 0,05 M EDTA
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> - Peptídeo Intestinal Vasoativo
µm	micrometro
µM	micro Molar

RESUMO

Introdução: Sabendo-se que o estímulo neurogênico de origem nociceptiva é considerado o deflagrador primário do processo de cicatrização da pele, que o CGRP e SP aumentam a proliferação de fibroblastos *in vitro*, e diante da falta de estudos correlacionando CGRP, SP e p53 e apoptose em queiloide torna-se importante investigar se os neuropeptídeos da pele podem influenciar a expressão de p53 e a apoptose no queiloide. Uma possível associação entre neuropeptídeos e o gene p53 poderia representar um novo caminho para um melhor entendimento fisiopatogênico das cicatrizes patológicas fibroproliferativas e, por conseguinte, o advento de tratamentos mais específicos. **Objetivo:** Investigar a expressão do gene p53 e o índice apoptótico em culturas de fibroblastos de queiloide, submetidos à ação dos neuropeptídeos CGRP e SP. **Métodos:** Foram cultivados fibroblastos de queiloide em meio de cultura com adição de CGRP e SP, e controle. O índice apoptótico, e o ciclo celular foram determinados por citometria de fluxo e a marcação de proteínas-chave da apoptose por espectrofotometria. A atividade celular foi avaliada ao longo do tempo e em períodos determinados, por MTT. A morfologia celular foi avaliada por microscopia confocal. **Resultados:** Foi padronizado um modelo de explante baseado nas diferenças biológicas das regiões específicas do queiloide. A atividade celular em fibroblastos de queiloide variou ao longo do tempo, sendo diferente entre os subgrupos celulares mas similar dentro de um mesmo subgrupo, mas não foi afetada pela adição de CGRP, SP ou CGRP+SP. Fibroblastos de queiloide das regiões periférica e central apresentaram maior expressão de p53 do que fibroblastos da pele adjacente ao queiloide, de cicatriz normotrófica ou de pele normal, adjacente à cicatriz normotrófica. CGRP, SP e CGRP+SP provocaram uma diminuição na expressão de p53 em fibroblastos de queiloide das regiões periférica e central em relação aos outros subgrupos estudados. **Conclusão:** CGRP, SP e CGRP+SP provocaram uma diminuição na expressão de p53 em fibroblastos de queiloide.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do quelóide ter sido primeiramente descrito há mais de três milênios nos Papiros de Smith, sua fisiopatogenia ainda permanece desconhecida (BERMAN & BIELEY, 1996). Um problema chave que contribui para essa dificuldade reside no fato do quelóide ser descrito apenas em humanos, fator que torna a pesquisa experimental *in vivo* ainda incipiente (O'SULLIVAN, O'SHAUGHNESSY, O'CONNOR, 1996; SCHIERLE, SCHOLZ, LEMPERLE, 1997, CHIN *et al.*, 2000; HOCHMAN *et al.*, 2004a; HOCHMAN *et al.*, 2004b; HOCHMAN *et al.*, 2005).

O quelóide, assim como a cicatriz hipertrófica, é caracterizado por uma deposição excessiva de fibras colágenas em uma cicatriz cutânea. Enquanto na cicatriz hipertrófica a deposição de colágeno se restringe às margens da ferida original, no quelóide, essa deposição ultrapassa espacialmente as margens, adquirindo uma forma tumoral (DATUBO-BROWN, 1990). Atualmente o quelóide é considerado uma neoplasia benigna. Foi demonstrado que fibroblastos provenientes de quelóide cultivados *in vitro*, mantêm, mesmo na ausência de fatores séricos, a produção de fibras colágenas (PLACIK & LEWIS, 1992; NIRODI *et al.*, 2000; KEIRA *et al.*, 2004a; KEIRA *et al.*, 2004b;).

Atualmente se aceita que a cicatriz hipertrófica seja uma expressão fenotípica de menor intensidade do quelóide, sendo ambos considerados, genericamente, cicatrizes fibroproliferativas (CRAIG, SCHOFIELD, JACKSON, 1975; CANARY *et al.*, 1990; DATUBO-BROWN, 1990; MUIR, 1990; PLACIK & LEWIS, 1992; McGROUTHER, 1994; REIS, 1994; BERMAN & BIELEY, 1996; O'SULLIVAN, O'SHAUGHNESSY,

O'CONNOR, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999; RAHBAN & GARNER, 2003; HOCHMAN *et al.*, 2005; HOCHMAN & FERREIRA, 2007; HOCHMAN *et al.*, 2007).

Segundo CROWE & PARKHOUSE (1994), as cicatrizes hipertróficas apresentam maior quantidade de fibras nervosas do que a pele ou do que as cicatrizes normotróficas. Além disso, constatou-se um aumento na quantidade de neuropeptídeos pró-inflamatórios, contidos nas terminações nervosas das cicatrizes hipertróficas, em relação à pele, em contraste com a quase ausência desses neurotransmissores nas cicatrizes normotróficas; portanto, existe uma atividade inflamatória nociceptiva nas cicatrizes hipertróficas (CROWE & PARKHOUSE, 1994; HOCHMAN *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009). Corroborando, HOCHMAN *et al.* (2008) demonstraram que o quelóide possui maior quantidade de fibras nervosas do que a pele.

As fibras nervosas possuem uma abundante quantidade de neuropeptídeos. Foi demonstrado que esses neurotransmissores especiais podem estimular a proliferação endotelial e de fibroblastos *in vitro* (HAEGERSTRAND *et al.*, 1990; KAHLER, HEROLD, WIEDERMANN, 1993). Dentre os descritos, o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) é o mais abundante na pele, sendo encontrado na inervação da derme e epiderme, glândulas sudoríparas, mecanorreceptores e nervos perivasculares (LOTTI, HAUTMANN, PANCONESI, 1995; HORDINSKY & ERICSON, 1996; ZANCANARO *et al.*, 1999; JOHANSSON, FANTINI, HU, 1999; ESTEVES JUNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004).

A proteína p53, considerada uma proteína supressora de tumor, está presente nas células normais em quantidades ínfimas. Em situações de estresse celular em que ocorram alterações na progressão normal do ciclo

celular ou mutações genômicas que possam levar a transformações oncogênicas, a proteína p53 é fosforilada se tornando ativa e promovendo uma série de eventos celulares, dentre eles a parada do ciclo celular e a indução da célula à apoptose (BOURDON *et al.*, 2003; OREN, 2003; VOUSDEN & LANE, 2007).

Estudando a expressão de p53 em fibroblastos de cicatrizes, TANAKA *et al.*, (2004) verificaram níveis mais elevados dessa proteína, respectivamente, em fibroblastos de queiloide, cicatrizes hipertróficas ativas, e cicatrizes hipertróficas inativas. As cicatrizes atróficas apresentaram níveis comparáveis ao controle (pele saudável, sem cicatriz). LU *et al.* (2007b) demonstraram que a expressão de p53 é significativamente maior na região central do queiloide em relação à região periférica, embora fibroblastos de ambos os grupos tenham apresentado uma resistência significativa a apoptose mediada por *Fas*¹. BALDWIN (2005) acredita que a resistência dos fibroblastos de queiloide à apoptose se deva a uma proteína p53 não funcional.

Curiosamente, em 2001, AKASAKA *et al.* demonstraram que fibroblastos de queiloide podiam ser identificados como células apoptóticas devido a seu alto teor de cromatina condensada e a fragmentos nucleares discretos.

Com base nessas controvérsias em relação à expressão da proteína p53 em queiloide e ao fato do estímulo neurogênico de origem nociceptiva ser considerado como o deflagrador primário do processo de cicatrização da pele, torna-se importante investigar se os neuropeptídeos da pele podem influenciar a expressão de p53 e a apoptose no queiloide. Uma possível associação entre neuropeptídeos e o gene p53 poderia representar um novo

¹ *Fas* - (proteína ligante Fas) proteína transmembrana pertencente à superfamília do TNF envolvida na homeostasia imunológica e na toxicidade mediada por célula, ligando-se ao receptor FAS e desencadeando a apoptose.

caminho para um melhor entendimento fisiopatogênico das cicatrizes patológicas fibroproliferativas e, por conseguinte, terapêuticas mais específicas.

2. OBJETIVO

Caracterizar diferenças biológicas de fibroblastos de queiloide.

Investigar a expressão do gene p53 e o índice apoptótico em culturas de fibroblastos de queiloide, submetidos à ação dos neuropeptídeos CGRP e SP.

3. LITERATURA

3.1. NEUROPEPTÍDEOS

KAHLER, HEROLD, WIEDERMANN (1993) investigaram os mecanismos do efeito de SP na proliferação de fibroblastos de pele humana cultivados e verificaram que SP não foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos cujo crescimento foi interrompido por carenciamento (privação de soro) por mais de 48h. Entretanto, na presença de ácido acetilsalicílico, SP estimulou potentemente o crescimento de fibroblastos. Foi encontrada uma curva dose-resposta em forma de sino, com estimulação máxima em concentrações picomolares. A análise dos sobrenadantes dos fibroblastos com crescimento interrompido, tratados com SP, indicou que SP provoca a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandina E2 (PGE(2)) e prostaciclina. Como padrões similares foram descritos para diversas citocinas pró-inflamatórias, algumas das quais conhecidas por agir como fatores de competência na proliferação, os autores caracterizaram o efeito mitogênico de SP, demonstrando que SP estimula o crescimento de fibroblastos de maneira típica de fatores de competência e concluíram que metabólitos do ácido araquidônico estão envolvidos na ação mitogênica dependente do ciclo celular de SP em fibroblastos de pele humana.

KAHLER *et al.* (1993), determinaram a habilidade de SP em promover a quimiotaxia em fibroblastos humanos. SP se mostrou um potente quimioatrativo para fibroblastos humanos *in vitro*, desencadeando

uma resposta migratória concentração-dependente. Ao se testar as propriedades quimioatrativas de fragmentos de SP, apenas o análogo C-terminal promoveu respostas migratórias, sugerindo que a responsividade quimiotática é amplamente codificada pela região C-terminal de SP, sabidamente ativa nos receptores de neurocininas. Essa habilidade dos fibroblastos em responder quimiotaticamente a SP elucida outra atividade pró-inflamatória desse neuropeptídeo.

KAHLER *et al.* (1996), considerando que SP, Fator de Crescimento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor* - FGF) e Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor* - EGF) são mitógenos para fibroblastos, testaram a interação de uma concentração submáxima de SP (10^{-9} M) com baFGF (FGF forma básica) (40 $\mu\text{g/ml}$) e EGF (0,01 $\mu\text{g/ml}$) na proliferação de fibroblastos humanos de pele carenciados (por privação de soro) e na liberação de metabólitos do ácido araquidônico e verificaram que uma combinação de SP e EGF estimula sinergisticamente a proliferação de fibroblastos e liberação de PGE₂, enquanto a adição de SP a culturas contendo FGF não afeta o crescimento celular. Assim, interações de SP com FGF e EGF afetaram diferentemente a resposta mitogênica dependente da formação de metabólitos de ácido araquidônico.

PARENTI *et al.* (1996) decidiram avaliar a migração celular e a distância percorrida por fibroblastos humanos de pele cultivados, após adição de SP ao meio de cultura, visto que a migração de fibroblastos é um importante componente da resposta tecidual durante o processo de reparo, e já tendo sido demonstrado que SP exerce efeitos tróficos.

A migração celular foi avaliada como sendo a distância percorrida pelos fibroblastos humanos de pele, aderentes (HF), após 96 h, e pelo

número de células individuais que se moveram através de um filtro em um período de 5 h. Em condições controle (1% soro), fibroblastos aderentes se moveram a partir do ponto de início por aproximadamente 700 μm . A adição de SP (10^{-11} - 10^{-7} M) aumentou a mobilização de HF de maneira concentração-dependente, com atividade máxima em 10^{-8} M (50% aumento na migração em relação ao controle). SP é um potente efetor da migração de fibroblastos e o receptor NK1 é responsável por esse efeito. Essas observações reforçam o papel específico do receptor NK1 na mediação da função trófica de SP em nível cutâneo.

KISS *et al.* (1999), sabendo que SP, CGRP e *alpha-melanocyte-stimulating hormone* (alfa-MSH) são capazes de regular a produção de citocinas na pele e que IL-8 exerce importante papel na inflamação cutânea, estudaram os efeitos de SP, CGRP e alfa-MSH no sistema IL-8/IL8-receptor (IL-8RA) de queratinócitos e fibroblastos dérmicos cultivados.

Culturas de fibroblastos dérmicos humanos e uma linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT) foram tratadas com 10^{-8} M de SP, CGRP ou alfa-MSH. SP e CGRP regularam positivamente (*upregulated*) a expressão de mRNA de IL-8RA, mas não tiveram efeito em sua produção de IL-8 (enquanto alfa-MSH não teve nenhum efeito sobre IL-8 ou IL-8RA nessas células). Em contraste, em fibroblastos, alfa-MSH desencadeou uma indução tempo-dependente na expressão de mRNA de IL-8, enquanto SP e CGRP não tiveram nenhum efeito em fibroblastos dérmicos (na concentração 10^{-8} M).

OLERUD *et al.* (1999), considerando que nervos sensoriais cutâneos mediam a inflamação e reparo de feridas pela liberação de neuropeptídeos

tais como SP, e que a Endopeptidase Neutra (*Neutral Endopeptidase - NEP*) é uma enzima de superfície celular que degrada SP, encerrando suas ações biológicas, avaliaram a expressão da NEP em pele normal e lesionada, assim como em células derivadas da pele humana. O mRNA para NEP foi detectado em queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais de pele normal e de feridas. Os autores concluíram sugerindo que a endopeptidase neutra talvez termine as ações pró-inflamatórias e mitogênicas de neuropeptídeos em pele normal e feridas.

BAE *et al.* (2002) investigaram os mecanismos regulatórios da indução autócrina de SP por fibroblastos humanos cultivados e demonstraram pela primeira vez que o mRNA de SP, o mRNA da NEP e o peptídeo SP podem ser induzidos por fibroblastos de pele normal em resposta a SP exógeno, e que SP derivado de fibroblastos pode desempenhar um importante papel na indução e aceleração de certas doenças cutâneas. Em condições não estimuladas, fibroblastos humanos normais expressam uma quantidade moderada de preprotaquiquina-A (PPT-A), um precursor do mRNA de SP, e a adição de SP exógeno regulou para cima (*upregulated*) significativamente a expressão do mRNA para PPT-A. Uma resposta máxima do peptídeo SP e de mRNA para SP em fibroblastos foi observada 1-3h após o estímulo com SP. Em contraste, a expressão de NEP mostrou-se elevada em fibroblastos estimulados com SP após 24 h. A administração de um inibidor de NEP aos fibroblastos induziu uma maior produção de SP. Além disso, os antagonistas (spantide, FK224 e FK888) do receptor de neurocinina (NK) e o inibidor de síntese de proteínas (cicloheximide) inibiram a produção de SP em 30-40% em relação à resposta controle. Em estudos de imunomarcação, observou-se marcação citoplasmática específica de SP em fibroblastos estimulados por

SP. Além disso, os autores confirmaram que a sequência nucleotídica do PPT-A expresso pelos fibroblastos correspondia exatamente à do cDNA de PPT-A do banco de genes humanos. Esse é o primeiro relato de que o mRNA de SP, o mRNA de NEP e o peptídeo SP podiam ser induzidos por fibroblastos humanos de pele normal em resposta a SP exógeno, e que o SP derivado de fibroblastos poderia desempenhar um papel importante na indução e aceleração de certas doenças cutâneas.

HU *et al.* (2002) investigaram o papel de SP na formação de cicatrizes hipertróficas, em fibroblastos dérmicos normais cultivados. Para isso, cultivaram fibroblastos dérmicos derivados de pele normal humana, na presença de SP apenas, ou juntamente com o antagonista seletivo não peptídico de taucicininina NK-1, L-703, 606 *oxalate salt*. Os autores demonstraram que SP aumenta a proliferação de fibroblastos dérmicos de maneira dose-dependente, com taxa máxima para concentrações de SP \geq 25 ng/ml. Após cultivo por 48h com 25 ng/ml SP, os fibroblastos expressaram mais mRNA para TGF β 1 do que aqueles que não receberam SP, sugerindo que SP deve desempenhar importante papel nas mudanças fenotípicas dos fibroblastos durante a cicatrização da pele.

Liu *et al.* (2006) investigaram a expressão do receptor para SP, NK-1R, em fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos humanos cultivados. Os autores demonstraram que fibroblastos e queratinócitos podem expressar NK-1R tanto em nível proteico quanto transcricional, e que essa expressão é modulada por SP, IFN-gama e Spantide I. Com isso, fibroblastos e queratinócitos estariam envolvidos na regulação da imunidade da pele, e NK-1R poderia desempenhar um papel importante na patogênese da Inflamação Alérgica Cutânea (*Cutaneous Allergic Inflammation – CAI*).

3.2. FIBRAS NERVOSAS EM CICATRIZES FIBROPROLIFERATIVAS

PARKHOUSE *et al.* (1992) estudaram cicatrizes hipertróficas, cicatrizes normotróficas e pele normal como controle.

Pesquisaram, por imuno-histoquímica, a presença de fibras nervosas e de neuropeptídeos, em nove cicatrizes hipertróficas, cinco cicatrizes normotróficas e três fragmentos de pele, utilizados como controle. As amostras foram obtidas de onze pacientes, com idade entre 22 e 59 anos.

Demonstraram uma maior quantidade de fibras nervosas na pele em relação às cicatrizes normotróficas, e uma maior densidade de fibras nervosas nas cicatrizes hipertróficas em relação à pele e às cicatrizes normotróficas. Demonstraram, ainda, que somente nas cicatrizes hipertróficas, as terminações nervosas imunocoradas conseguiam penetrar na densa matriz colágena, ficando orientadas na direção dos fibroblastos. Outra diferença demonstrada foi a presença de neuropeptídeos pró-inflamatórios, na base da epiderme, apenas nas cicatrizes hipertróficas. Os autores concluíram que as cicatrizes hipertróficas apresentam um caráter neural peculiar, não existente nas cicatrizes normotróficas e na pele.

CROWE *et al.* (1994) estudaram cicatrizes hipertróficas, cicatrizes normotróficas e pele normal como controle. Para tal, pesquisaram a presença de neuropeptídeos em relação aos sintomas de prurido e dor de cicatrizes hipertróficas. Utilizaram nove amostras de tecido de cicatrizes

hipertróficas, cinco de cicatrizes normotróficas e três amostras de pele, como controle, obtidas da região adjacente das cicatrizes. As amostras foram obtidas de onze pacientes, com idade entre 22 e 59 anos. Os cortes histológicos foram corados por imunofluorescência. Os autores demonstraram um aumento no número de neuropeptídeos pró-inflamatórios, contidos nas terminações nervosas das cicatrizes hipertróficas, em relação à pele, em contraste com a ausência desses neurotransmissores nas cicatrizes normotróficas, havendo, portanto, uma atividade inflamatória nociceptiva nas cicatrizes hipertróficas.

ALTUN *et al.* (2001) estudaram cicatrizes hipertróficas e cicatrizes normotróficas por queimadura, e pele normal como controle.

Realizaram um estudo prospectivo para investigar a proliferação de fibras nervosas durante a cicatrização de queimaduras e analisar possíveis diferenças entre cicatrizes hipertróficas e normotróficas por queimadura.

Nesse estudo, obtiveram amostras de 22 pacientes, com idade entre 19 e 74 anos, com cicatrização espontânea de queimaduras. Amostras das cicatrizes e de pele adjacente, como controle, foram obtidas, de cada paciente, com um, quatro e sete meses após a queimadura. No 4º e 7º mês as cicatrizes das queimaduras foram classificadas como hipertróficas ou normotróficas. As lâminas foram coradas por imuno-histoquímica por anticorpos monoclonais para *Protein Gene Product 9,5* (PGP 9,5) e CGRP, e anticorpos policlonais para SP, Neurocinina A (*Neurokinin A*, NK-A), Peptídeo Intestinal Vasoativo (*Vasoactive Intestinal Peptide*, VIP) e Neuropeptídeo Y (*Neuropeptide Y*, NPY). Dois investigadores examinaram as fibras nervosas na epiderme e derme papilar, da cicatriz e da pele. Os resultados demonstraram um aumento progressivo na quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes, principalmente a partir do 4º mês pós-queimadura.

Entretanto, até o 7º mês, essa quantidade não atingiu o nível de inervação da pele, nem nas cicatrizes normotróficas nem nas hipertróficas. Observou-se, também, um aumento da quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes normotróficas em relação às hipertróficas. Não foram observadas diferenças significativas referentes à presença de neuropeptídeos. Os autores concluíram que a maior quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes normotróficas, em relação às hipertróficas, poderia ser devido a uma função reguladora específica das fibras nervosas cutâneas no mecanismo de cicatrização por queimadura.

ZHANG & LAATO (2001) estudaram fibras nervosas de cicatrizes hipertróficas, normotróficas e pele normal como controle. As amostras de cicatriz hipertrófica foram obtidas de dois pacientes, com evolução cicatricial de 5 e 13 meses. As cicatrizes normotróficas foram obtidas também de dois pacientes, com evolução de nove dias e 22 anos. Amostras de pele normal foram obtidas de quatro pacientes, a partir do excesso de pele remanescente da excisão de cicatrizes hipertróficas. Por meio de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo de camundongo monoclonal anti-proteína de neurofilamentos, constataram que a cicatriz hipertrófica estava permeada por um número maior de ramos axônicos em comparação à pele, e que a pele, por sua vez, continha um número maior de fibras em relação à cicatriz normotrófica. A partir desses resultados, os autores propuseram uma razão para as cicatrizes hipertróficas apresentarem-se dolorosas, e para as cicatrizes normotróficas apresentarem-se hipoestésicas, indicando o envolvimento do componente neural nas cicatrizes hipertróficas.

HOCHMAN *et al.* (2008) pesquisaram, por imuno-histoquímica, a presença de fibras nervosas em queiloide de 27 pacientes do gênero feminino, não caucasianas, com idade entre 15 e 55 anos e média de 30 anos, com queiloide no tronco, com pelo menos um ano de evolução e compararam com amostras de pele normal utilizadas como controle. Demonstraram que o queiloide possui maior quantidade de fibras nervosas do que a pele e que as fibras nervosas estão mais profundamente localizadas no queiloide em relação à pele. Os autores afirmam, ainda, ter havido uma clara impressão de que as fibras nervosas do queiloide se apresentaram mais finas e alongadas do que as da pele normal, possivelmente devido à pressão exercida pela intensiva compressão fibrosa, embora não tenham sido efetuadas medidas específicas.

3.3. P53, CASPASE-3 E APOPTOSE EM QUELOIDE

LADIN *et al.* (1998) investigaram a expressão de proteínas-chave envolvidas na regulação da apoptose em queiloide. Vinte amostras embebidas em parafina foram selecionadas aleatoriamente de um arquivo para um ensaio de imunoperoxidase com anticorpos anti-fas, anti-p53, anti-bcl-2 e anti-bcl-x. A apoptose foi avaliada nos queiloide e em pele normal, e também em fibroblastos de queiloide e de pele normal pelo ensaio de TUNEL (Marcação por dUTP das extremidades cortadas, mediada por desoxinucleotidil transferase terminal - *terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling* TUNEL), em cortes de tecidos e culturas de fibroblastos, e por citometria de fluxo, em células em suspensão. Das 20 amostras de queiloide, 18 expressavam a proteína p53; a proteína bcl-2 era expressa pelos fibroblastos de queiloide em 19 de 20

amostras, e todas apresentaram uma expressão significativa de fas por todo o tecido. A distribuição desses três antígenos era regional dentro de cada lesão, e seguia um padrão consistente, com uma expressão colocalizada de p53 e bcl-2 nas áreas periféricas, hiper celularizadas de cada queiloide, em um padrão perinuclear ($p < 0,001$). Em contrapartida, os autores demonstraram uma distribuição inversa da expressão de fas, com a impregnação de corante estando muito mais difusa através das superfícies celulares e limitada às regiões mais hipocelularizadas em 16 de 17 amostras de queiloide ($p < 0,001$). Não foi verificado um padrão de coloração específico nessas amostras para o anticorpo anti-bcl-x. Os estudos *in vitro* com fibroblastos de queiloide cultivados (obtidos de seis pacientes) revelaram a manutenção do fenótipo p53+, bcl-2+ até a décima passagem. Fibroblastos de pele normal ou neonatal não expressaram quaisquer dos antígenos, mas podiam ser induzidos a expressar p53 quando expostos a adriamicina. Os autores também relataram que as lesões queiloideanas e os fibroblastos de queiloide apresentaram taxas de apoptose mais baixas do que os controles normais. Fibroblastos de queiloide apresentaram taxas de apoptose mais altas em resposta a tratamentos com hidrocortisona, interferon gama e hipoxia quando comparados com fibroblastos adultos normais. Uma desregulação focal de p53 combinada com uma suprarregulação de bcl-2 poderia ajudar a produzir uma combinação de proliferação celular aumentada e morte celular diminuída nas áreas mais jovens e hiper celularizadas do queiloide. Esse fenótipo é revertido nas áreas mais antigas do queiloide, e, segundo os autores, talvez previna uma degeneração maligna, favorecendo então a apoptose normal conforme evidenciado pela expressão proeminente de fas.

MESSADI *et al.* (1999) investigaram a heterogeneidade entre fibroblastos derivados de pele normal e cicatriz queloidiana para determinar se a apoptose aberrante desempenha um papel na cicatrização patológica de feridas como a que ocorre na cicatrização hipertrófica e na formação do quelóide. Para tal, examinaram perfis apoptóticos e vias dessas células. Análises quantitativas de células apoptóticas utilizando um ensaio de ligação de Anexina-V-FITC mostraram que culturas de fibroblastos de pele normal apresentam um percentual de células apoptóticas duas vezes maior do que culturas de fibroblastos de quelóide. Os autores realizaram ainda um ensaio de proteção à ribonuclease em fibroblastos expostos a anticorpos anti-Fas e a fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) para ativar a via apoptótica do receptor Fas/TNF. Concluíram que, em comparação aos fibroblastos de pele normal, os fibroblastos de quelóide apresentaram uma expressão diminuída dos genes associados à apoptose.

SAYAH *et al.* (1999) compararam a expressão de 64 genes relacionados à apoptose em quelóide e cicatriz normal para investigar o papel potencial da apoptose na formação do quelóide. Para isso, isolaram dois conjuntos de mRNA, separadamente, de quelóide e de cicatriz normal de quatro pacientes não tratados previamente. Os autores realizaram um ensaio de hibridização de cDNA humano por *array* a fim de comparar a expressão de genes relacionados à apoptose entre esses dois grupos. Além disso, ensaios de TUNEL foram realizados para avaliar o percentual de células apoptóticas no quelóide (região central e periférica) em relação às cicatrizes normais. Dos 64 genes relacionados à apoptose estudados, 8 encontravam-se subexpressos no tecido queloidiano. A análise da apoptose pelo ensaio de TUNEL revelou índices apoptóticos inferiores em tecido

queloideano, sendo de 0,83 para a região periférica do queloide e 0,67 para a região central, contra o índice 1,00 da cicatriz normal. A hipótese proposta pelos autores é que os fibroblastos de queloide sofrem menos morte celular programada e, assim, continuam a produzir e secretar tecido conjuntivo além do período esperado em uma formação de cicatriz normal, o que caracteriza sua natureza progressiva e hipertrófica. Ainda segundo eles, esse mecanismo pode levar a novas possibilidades para o tratamento do queloide pela indução da apoptose.

AKASAKA *et al.* (2000) quantificaram por imuno-histoquímica, em tecidos cicatriciais humanos ressecados, níveis diferenciais de expressão de caspase-3 e caspase-2, ativadas durante a apoptose *in vitro*, com o objetivo de examinar o fenômeno de apoptose e seu envolvimento no processo de cicatrização patológica. Para tal, os autores dividiram 33 casos de cicatrizes planas normais e 18 casos de cicatrizes patológicas (15 casos de cicatrizes hipertróficas e 3 casos de queloide) em 3 grupos (S1 = <10 meses; S2 = 10 a 40 meses; e S3 = >40 meses) de acordo com o tempo desde a formação da cicatriz (tempo de “duração” da cicatriz). Em todos os três grupos examinados, as pontuações semiquantitativas para a marcação da caspase-3 foram significativamente superiores para a combinação de cicatrizes hipertróficas e queloide como um grupo, quando comparado com as cicatrizes planas normais, sugerindo uma sobrevivência celular reduzida e maior morte celular por apoptose em cicatrizes hipertróficas e queloide. A apoptose e as atividades proteolíticas das caspases foram examinadas *in vitro* utilizando-se duas linhagens de fibroblastos derivadas de cicatrizes planas normais (FSFB-1 e 2) e duas derivadas de queloide (KFB-1 e 2). Após 24 horas de privação de soro, a quantidade de células apoptóticas aumentou significativamente em ambas as linhagens KFB, mas essa mesma

privação não resultou em aumento significativo no número de células apoptóticas de FSFB-1. Após a privação de soro, foram detectados aumentos significantes nas atividades proteolíticas da caspase-3 em ambas as linhagens KFB em comparação a ambas as linhagens FSFB. Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes na atividade da caspase-8 entre as linhagens KFB e FSFB tratadas de forma similar. Além disso, a apoptose induzida por privação de soro das células KFB-2 foi significativamente inibida pelo inibidor de caspase-3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometil cetona (DEVD-FMK), indicando que a caspase-3 tem um papel importante na apoptose induzida por privação de soro nas células da linhagem KFB-2. Considerando o papel da caspase-3 como uma molécula-chave efetora na execução do estímulo apoptótico, os resultados sugeriram que a expressão aumentada da caspase-3 em cicatrizes hipertróficas e queiloide induz a apoptose dos fibroblastos, que deve desempenhar um papel no processo da cicatrização patológica.

AKASAKA *et al.* (2001) demonstraram que fibroblastos de queiloide podem ser identificados como células apoptóticas devido à sua cromatina altamente condensada e seus fragmentos nucleares discretos. Para investigar ainda mais a apoptose, os autores quantificaram o número de células TUNEL-positivas em tecidos ressecados cirurgicamente de queiloide (n=10), cicatrizes hipertróficas (n=10), cicatrizes normotróficas (n=10), e dermatofibromas (n=10). O número de células TUNEL-positivas foi relativamente baixo, mas significativamente maior para o grupo queiloide em comparação com o grupo cicatriz normotrófica, sugerindo uma sobrevivência celular reduzida e morte celular por apoptose aumentada em uma subpopulação de fibroblastos de queiloide. Além disso, o número de células TUNEL-positivas foi significativamente maior no grupo queiloide em

comparação ao grupo dermatofibroma, sugerindo que uma subpopulação de fibroblastos de quelóide possa suprimir a tumorigenicidade em uma taxa mais elevada do que o grupo dermatofibroma por meio de morte celular. As cicatrizes hipertróficas apresentaram taxas de apoptose significativamente mais altas do que as normotróficas. Assim, esses resultados sugeriram que fibroblastos selecionados em quelóide e nas cicatrizes hipertróficas sofrem apoptose, o que poderia desempenhar um papel importante no processo de cicatrização patológica.

LUO *et al.* (2001) desenvolveram um modelo de cultura para estudar o papel da proliferação e da apoptose na etiologia do quelóide. Fibroblastos de seis pacientes portadores de quelóide foram isolados a partir das regiões superficial, central e basal, e cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) - DMEM com 10% de soro. O comportamento de crescimento em cultura de cada grupo foi examinado em culturas de curto e longo prazo, e o percentual de células apoptóticas foi determinado por marcação *in situ* de extremidade fragmentada de DNA. Os fibroblastos obtidos das regiões basal e superficial apresentaram tempo de duplicação e de densidade de saturação similares aos de fibroblastos normais de mesmo tempo de cultivo. Por outro lado, fibroblastos do centro do quelóide apresentaram tempo de duplicação significativamente reduzido (25,9 +/- 6,3h *versus* 43,5 +/- 6,3h para fibroblastos normais) e alcançaram maiores densidades de saturação. Em culturas de longo prazo, fibroblastos da região central do quelóide formaram uma estrutura tridimensional estratificada, contraíram a matriz extracelular e originaram agregados celulares nodulares, mimetizando a formação do tecido quelóideano. Células apoptóticas foram detectadas tanto nos fibroblastos normais quanto nos derivados de quelóide, mas seus

números eram duas vezes maiores nos fibroblastos normais. Para examinar se a apoptose mediava o efeito terapêutico da radiação ionizante em queiloide, as células foram expostas a radiação gama na dose de 8 Gy. Nessas condições, a população de células apoptóticas dobrou. Esses resultados indicaram que o balanço entre a proliferação e a apoptose está alterado no queiloide, e pode ser responsável pela formação dos tumores queiloideanos. Os resultados também sugeriram que o queiloide contém pelo menos duas frações diferentes de fibroblastos, que variam em comportamento de crescimento e metabolismo de matriz extracelular.

TANAKA *et al.* (2004) investigaram a expressão de três proteínas da família da p53 (proteínas p53, p63 e p73) em cicatrizes com diversas manifestações clínicas. Para tal, prepararam 40 lesões cicatriciais, compreendendo queiloide, cicatrizes hipertróficas e cicatrizes atróficas. A detecção da expressão das proteínas p53, p63 e p73 foi feita por Western blot e estudo histopatológico em cada amostra. As 40 lesões foram divididas em quatro grupos, segundo suas manifestações clínicas: queiloide (A), cicatrizes hipertróficas vermelhas (B), cicatrizes hipertróficas brancas e duras (C), cicatrizes atróficas brancas (D). Nos grupos A e B, os achados histopatológicos demonstraram um aumento no número de fibroblastos, vasos capilares e infiltração de células inflamatórias. No grupo C, a maioria dessas alterações diminuiu, mas a proliferação de fibras colágenas estava evidente. No grupo D, o grau de proliferação das fibras colágenas foi muito menor e os vasos capilares, assim como a infiltração de células inflamatórias não estavam evidentes. Os autores verificaram níveis mais elevados de proteína p53 nos grupos A, B e C, tendo sido esses níveis maiores na ordem: Grupo A (queiloide), B e C, consecutivamente. No grupo D, o nível de p53 encontrado foi quase igual ao do grupo controle. O nível

de p63 não apresentou variações, sendo quase igual ao do controle em todos os grupos. O nível de p73 encontrou-se elevado apenas no grupo C. Os autores concluíram que os membros da família p53 comportam-se de maneira diferente nos diversos tecidos cicatriciais. Sugeriram que essas proteínas desempenham diferentes papéis na formação da cicatriz e no desenvolvimento de cicatrizes desfavoráveis.

AKASAKA *et al.* (2005) analisaram a expressão de caspase-9 e caspase-3 ativadas, em fibroblastos de queloide, com o objetivo de caracterizar a apoptose em queloide e os mecanismos responsáveis por esse processo. Análises de imuno-histoquímica revelaram que o número de fibroblastos TUNEL-positivos ou de caspase-9 ou caspase-3 ativadas era baixo, mas ainda assim, era significativamente mais elevado em tecidos queloideanos do que em tecidos cicatriciais normais. Relações significantes entre o número de fibroblastos caspase-positivos e de fibroblastos TUNEL-positivos sugeriram que a ativação da caspase-9 ou da caspase-3 induz apoptose em uma subpopulação de fibroblastos de queloide. Todas as linhagens estabelecidas de fibroblastos de queloide nesse estudo apresentaram ativação da caspase-9 e da caspase-3 após a privação de soro, o que foi demonstrado por Western blot. Além do mais, a apoptose induzida por privação de soro em uma linhagem fibroblástica foi bloqueada por um inibidor de caspase-9 (acetil-Leu-Glu-His-Asp-al), indicando que a ativação da caspase-9 era necessária para o processo de apoptose em fibroblastos de queloide. Embora a privação de soro não tenha alterado significativamente o nível do fator ativador de proteases pró-apoptóticas-1 (*apoptosis protease activating factor-1* - APAF-1) em qualquer das linhagens, a liberação de citocromo c foi detectada em frações citosólicas das linhagens após privação de soro por 3 ou 4 horas. Esses resultados

sugerem firmemente que fibroblastos de queiloide são predispostos à apoptose e à liberação de citocromo c, e que a ativação da caspase-9 pode estar na base da regulação da apoptose em fibroblastos de queiloide *in vivo*.

LU *et al.* (2007a) conduziram um estudo comparativo sobre a transdução do sinal apoptótico em fibroblastos humanos cultivados, derivados de dez pacientes portadores de queiloide e cicatrizes hipertróficas. A indução de apoptose utilizando o anticorpo Fas e a expressão das proteínas relacionadas à apoptose, Fas e Bcl-2, foi medida por citometria de fluxo. Os autores demonstraram que os fibroblastos derivados de queiloide são significativamente resistentes à apoptose mediada por Fas quando comparados aos fibroblastos derivados de cicatrizes hipertróficas. Não houve diferença significativa no nível de expressão de Bcl-2 entre os dois grupos, mas a expressão de Fas foi maior no queiloide do que na cicatriz hipertrófica.

LU *et al.* (2007b) investigaram as diferenças biológicas entre as áreas centrais e periféricas do queiloide. Para tal, cultivaram fibroblastos coletados das áreas centrais e periféricas de queiloide da região peitoral de seis pacientes. A distribuição do ciclo celular e a indução de apoptose foram analisadas por citometria de fluxo, e com um anticorpo anti-Fas. A expressão das proteínas relacionadas à apoptose (Fas, Bcl-2 e p53) foi medida por citometria de fluxo. Os fibroblastos derivados de ambas as regiões do queiloide apresentaram resistência significativa à apoptose mediada por Fas. A análise da distribuição do ciclo celular indicou que aproximadamente 60% dos fibroblastos derivados das regiões periféricas do queiloide estavam em períodos proliferativos do ciclo celular (fases G2 e S). Entretanto, a maioria dos fibroblastos derivados da região central

encontrava-se nas fases G0 ou G1. A expressão de Fas e de Bcl-2 não diferiu significativamente entre os dois grupos, mas a expressão de p53 foi muito maior nos fibroblastos derivados das partes centrais do que das partes periféricas. Os autores sugeriram que as diferenças na distribuição do ciclo celular e na expressão de p53 poderiam estar relacionadas com as diferentes características de crescimento das regiões periférica e central do queiloide.

4. MÉTODOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Unifesp, tendo sido aprovado. CEP 0264/08 (Apêndice 1).

Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos a seguir, após assinatura de termo de consentimento (Apêndice 2).

4.1. Amostra

4.1.1. Caracterização da Amostra

As amostras de células foram obtidas de 10 pacientes portadores de queiloide e de 6 pacientes portadores de cicatrização normotrófica (cicatriz normal). Os pacientes foram do gênero feminino com idade entre 18 a 50 anos e tipo de pele II ou maior segundo a classificação de Fitzpatrick.

Referente aos critérios de inclusão, definiu-se a localização do queiloide e das cicatrizes normotróficas em uma extensão anatômica delimitada, em sentido súpero-inferior, entre um plano transversal posicionado em ambos os pontos antropométricos *acromion* (a), e um plano transversal no nível do ponto *xiphoidale* (xi), situado entre o corpo do esterno e o processo xifoide do esterno (figura 1) (ERDMANN, 1997). As lesões queiloideanas estavam em atividade clínica apresentando prurido e/ou dor, com área de involução central (*i.e.*, apresentando relevo mais baixo na região central do que na periférica) e tinham dimensões mínimas de 3 cm no eixo longitudinal por 2 cm no eixo transversal. As cicatrizes

normotróficas tinham largura mínima de 2 mm. Os fragmentos de pele foram obtidos a partir da porção de pele adjacente à lesão.

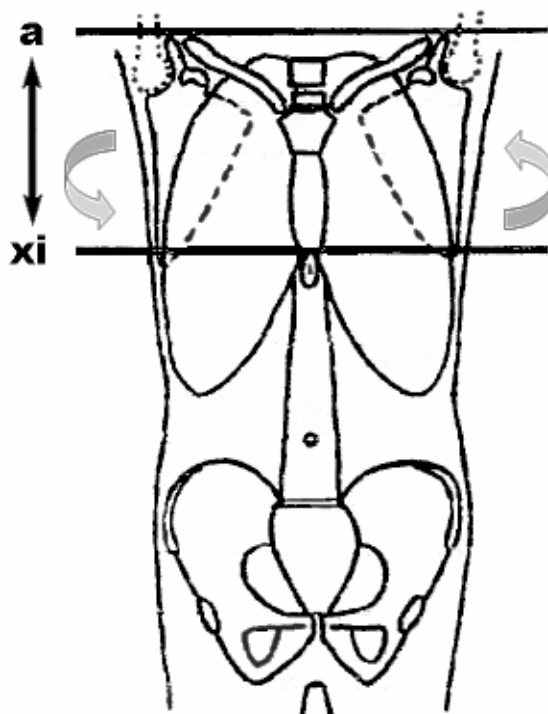


FIGURA 1 – Região corporal doadora de amostras de queiloide: região torácica anterior delimitada pelos limites súpero-inferior (a) x (xi) e limites latero-lateral.

Os fragmentos de pele, queiloide e cicatrizes normotróficas foram obtidos em procedimentos cirúrgicos de pacientes do ambulatório “Casa da Cirurgia Plástica”, pertencente à Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo.

Os critérios de exclusão para as lesões foram queiloide submetido a qualquer tipo de tratamento prévio e cicatrizes normotróficas com antecedentes de cicatrização hipertrófica em qualquer local do corpo;

pacientes em menopausa; pacientes com dermatopatias crônicas, doença metabólica, doença do colágeno ou doença autoimune degenerativa, qualquer tipo de neoplasia maligna, ou que estiveram sob tratamento sistêmico ou tópico com corticosteroide.

4.1.2. Delineamento Experimental

A presente pesquisa consiste em um estudo experimental, autocontrolado, comparativo. Para o delineamento experimental foram formados dois grupos, distribuídos da seguinte maneira:

O primeiro grupo, denominado **Grupo Queloides** (GQ), constituído por fibroblastos obtidos de pacientes portadores de queloides e com um total inicial de 10 indivíduos ($n=10$). Os diversos experimentos foram conduzidos com um “n” mínimo de 3 ($n\geq 3$), sempre em duplicatas ou triplicatas. O grupo queloides foi distribuído em subgrupos de fibroblastos provenientes de amostras de queloides central (QC), fibroblastos provenientes de amostra de queloides periférico (QPF) e fibroblastos provenientes da pele adjacente ao queloides (QPele).

O segundo grupo, quando presente, foi denominado **Grupo Cicatriz** (GC), constituído por fibroblastos obtidos de indivíduos portadores de cicatrizes normotróficas (cicatriz normal) na mesma região de estudo do queloides e com um total inicial de 6 indivíduos ($n=6$). Os diversos experimentos foram conduzidos com um “n” mínimo de 3 ($n\geq 3$), sempre em duplicatas ou triplicatas. As análises referentes a cada indivíduo foram subdivididas em fibroblastos provenientes de cicatriz normotrófica (CC) e fibroblastos provenientes da pele adjacente à cicatriz (CP). Esse grupo serviu como um controle extra para alguns dos experimentos realizados no

grupo queloide, já que a cicatriz normotrófica é um parâmetro de comparação (controle) para o queloide ou cicatriz queloideana.

Ambos os grupos foram, ainda, subdivididos em **Controle e Experimental**, sendo que o grupo Controle não recebeu adição de neuropeptídeos, e o grupo Experimental recebeu adição dos neuropeptídeos CGRP e SP.

O delineamento pode ser melhor compreendido por meio do esquema, no quadro 1 abaixo:

QUADRO 1 – Delineamento experimental – grupos e subgrupos

GRUPO QUELOIDE	
- FIBROBLASTOS QUELOIDE PERIFÉRICO (CONTROLE)	QPF Controle
- FIBROBLASTOS QUELOIDE CENTRAL (CONTROLE)	QC Controle
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE AO QUELOIDE (CONTROLE)	QPele Controle
- FIBROBLASTOS QUELOIDE PERIFÉRICO + CGRP	QPF CGRP
- FIBROBLASTOS QUELOIDE CENTRAL + CGRP	QC CGRP
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE AO QUELOIDE + CGRP	QPele CGRP
- FIBROBLASTOS QUELOIDE PERIFÉRICO + SP	QPF SP
- FIBROBLASTOS QUELOIDE CENTRAL + SP	QC SP
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE AO QUELOIDE + SP	QPele SP
- FIBROBLASTOS QUELOIDE PERIFÉRICO + CGRP + SP	QPF X
- FIBROBLASTOS QUELOIDE CENTRAL + CGRP + SP	QC X
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE AO QUELOIDE + CGRP + SP	QPele X
GRUPO CONTROLE CICATRIZ	
- FIBROBLASTOS CICATRIZ NORMOTRÓFICA (CONTROLE)	CC Controle
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE À CICATRIZ (CONTROLE)	CP Controle
- FIBROBLASTOS CICATRIZ NORMOTRÓFICA + CGRP	CC CGRP
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE À CICATRIZ + CGRP	CP CGRP
- FIBROBLASTOS CICATRIZ NORMOTRÓFICA + SP	CC SP

- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE À CICATRIZ + SP	CP SP
- FIBROBLASTOS CICATRIZ NORMOTRÓFICA + CGRP + SP	CC X
- FIBROBLASTOS PELE ADJACENTE À CICATRIZ + CGRP + SP	CP X

4.2. Coleta de Fragmentos de Pele Humana Normal e de Queloides.

As pacientes foram operadas na “Casa da Cirurgia Plástica”, sob anestesia local, utilizando-se lidocaína a 2%, com adrenalina em solução a uma concentração de 1/200.000. Cada quelóide foi excisado no plano da tela subcutânea, por incisão fusiforme justaquelóideana, com bisturi de lâmina nº15, incluindo nas extremidades um fragmento de pele, correspondente à retirada do excedente cutâneo necessário para uma adequada coaptação da sutura nas extremidades, conforme exemplificado na figura 2.



FIGURA 2 – Excisão do quelóide em monobloco. (a) – Marcação no paciente da região de excisão do quelóide, de forma fusiforme justaquelóideana, incluindo fragmentos de pele adjacente nas extremidades. (b-c) – Quelóide excisado.

Foram obtidas amostras circulares de quelóide, cicatriz normotrófica e pele normal, das peças operatórias, utilizando-se um *punch* circular de 3 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade, contendo epitélio e tecido

conjuntivo. As amostras de cicatriz e pele do Grupo Controle Cicatriz (GCC) foram obtidas da seguinte maneira: CC (cicatriz) obtida do trecho de cicatriz e CP (pele adjacente) obtida do setor de pele adjacente, a uma distância de, pelo menos, 2,0 mm da margem da cicatriz. As amostras de queuloide e pele do Grupo Queuloide (GQ) foram obtidas da seguinte maneira: QPF (periférico) da região periférica da lesão a partir de uma distância de, pelo menos, 1,0 mm da margem do queuloide; QC (central) da região central do queuloide, a partir da interseção em ângulo reto entre o maior eixo longitudinal e o maior eixo transversal da lesão, sendo os demais fragmentos retirados de forma centrípeta em relação ao primeiro, respeitando uma distância de, pelo menos, 5,0 mm da margem do queuloide e QP (pele adjacente) do setor de pele adjacente ao queuloide, a partir de, pelo menos, 2,0 mm da margem do queuloide. Foram obtidos pelo menos 3 fragmentos de cada região (figura 3).

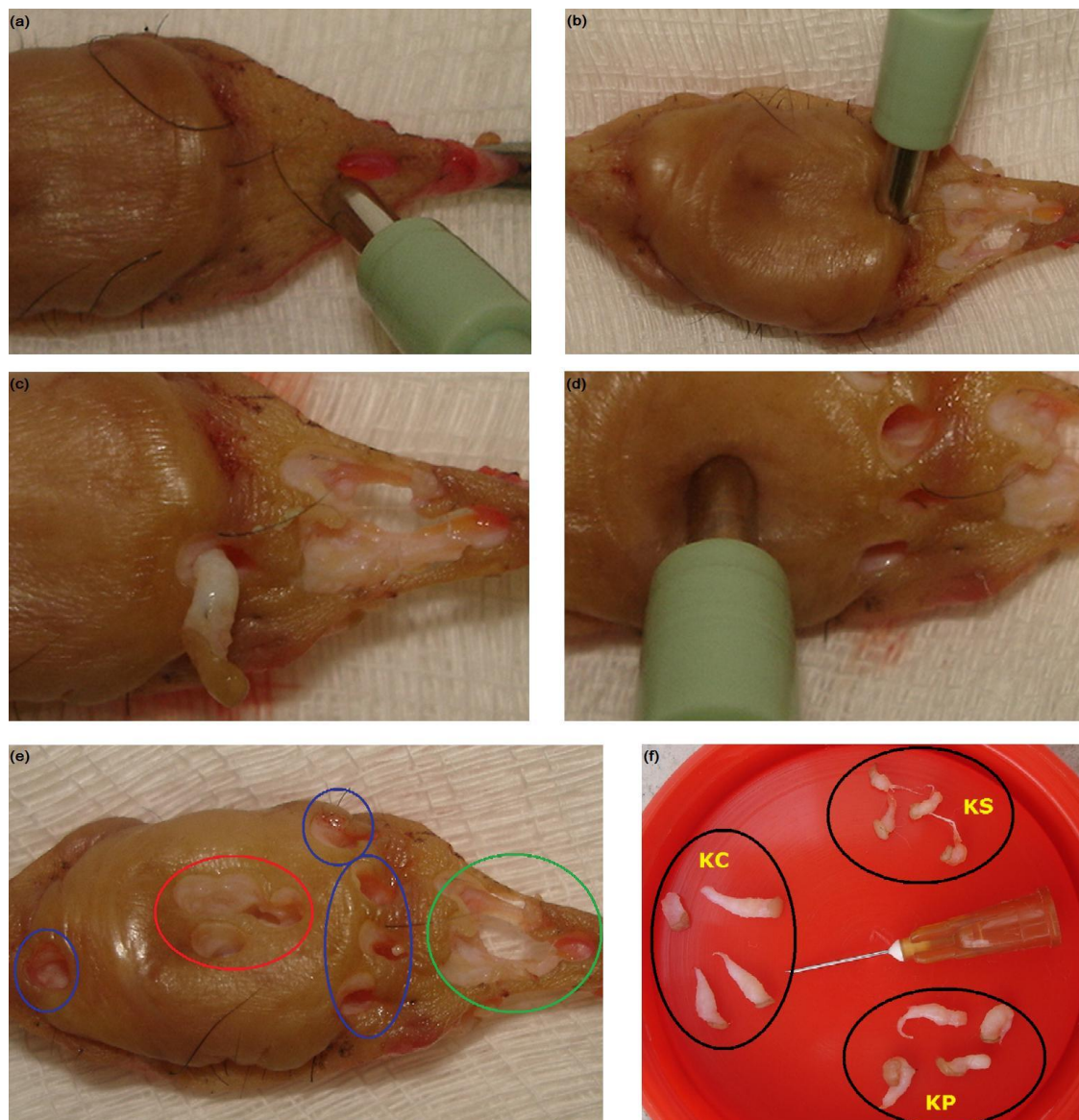


FIGURA 3 – Obtenção das amostras das diferentes regiões do queuloide utilizando *punch* circular de 3 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade. (a) – Retirada de fragmentos da pele adjacente ao queuloide. (b) – Retirada do primeiro fragmento da região periférica, sendo o *punch* posicionado em uma das extremidades longitudinais. (c) – Detalhe do fragmento obtido da região periférica do queuloide. (d) – Retirada do primeiro fragmento da região central do queuloide. (e) – Aspecto final da peça cirúrgica mostrando os orifícios após a remoção dos fragmentos. Em vermelho, orifícios da região central do queuloide. Em azul, da região periférica, e em verde, da pele adjacente ao queuloide. (f) – Fragmentos obtidos da região central do queuloide (KC), região periférica (KP) e pele adjacente (KS).

As amostras foram inseridas em tubos cônicos de 50 ml contendo 40 ml de meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM) (Cultilab, Campinas, SP) e estocadas a 4°C para serem transportadas ao laboratório. As amostras foram processadas em no máximo 6 horas após a coleta. A técnica de coleta e cultura foi padronizada em nosso Laboratório de Cultura de Células Ecto- e Mesodérmica da Cirurgia Plástica da Unifesp, respeitando e confirmando as diferenças biológicas das regiões do queiloide (TUCCI-VIEGAS *et al.*, 2010 e Apêndice 5).

4.2.1. Cultura Primária de Fibroblastos

A cultura primária de fibroblastos foi realizada por meio da técnica original de explante (CRAIG, SCHOFIELD, JACKSON, 1975; RUSSEL & WITT, 1976) amplamente empregada no Laboratório de Cultura de Células Ecto- e Mesodérmica da Cirurgia Plástica da Unifesp, adaptada e padronizada especificamente para a cultura de fibroblastos de queiloide (TUCCI-VIEGAS *et al.*, 2010). Inicialmente os fragmentos coletados foram colocados em tubos cônicos de 15 ml contendo 10 ml de tampão PBS (Solução salina tamponada com fosfato, *Phosphate-Buffered Saline* – Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) com antibióticos penicilina (100UI/ml; Gibco®, Carlsbad, CA, USA) e estreptomicina (100 µm/ml; Gibco®, Carlsbad, CA, USA) para lavagem. Os tubos foram agitados manualmente, vigorosamente, por cerca de 45 segundos. Esse procedimento foi repetido por 6 vezes com troca de tubos e PBS a cada lavagem. Os fragmentos foram, então, incubados por 30 minutos a 37 °C em 10 ml DMEM. Em seguida, 03-05 fragmentos de cada região foram transferidos para placas de Petri de 60 mm de diâmetro, deixadas

semiabertas dentro do fluxo laminar (Class IIA B3, Forma Scientific) por 30 minutos (tempo necessário para adesão dos fragmentos ao fundo da placa).

Em seguida, aplicou-se 6 ml de meio de cultura para fibroblastos (descrito abaixo), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA), cuidadosamente, em cada placa. As placas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C, e 5% CO₂.

O meio foi trocado a cada 48 horas para manutenção do pH entre 7,6 e 7,8 a fim de favorecer o balanço entre a cultura celular e a atividade de biossíntese celular dos fibroblastos (CECCARINI & EAGLE 1971; BOOTH, POLAK, UITTO, 1980). A proliferação satisfatória foi obtida em cerca de 7 a 10 dias, variando segundo a amostra (NIGRA, MARTIN, EAGLE, 1973; BOOTH, POLAK, UITTO, 1980; CAMPANER *et al.*, 2006).

4.2.1.1. Meio de Cultura para Fibroblastos

O meio de cultura para fibroblastos foi composto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio *Eagle* Modificado por *Dulbecco*, Cultilab, Campinas, SP) contendo 3,7 g/l bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 2,4 g/l tampão HEPES (*N*-2-*Hydroxyethylpiperazine-N'*-2-*Ethane Sulfonic Acid*) (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA), penicilina (100 UI/ml, Gibco®, Carlsbad, CA, USA) e estreptomicina (100 µg/ml, Gibco®, Carlsbad, CA, USA) em água bidestilada *milli-Q*, filtrada em membrana de celulose de 0,22 µm. A esse meio acrescentou-se 15% SFB inativado (Sigma Chemical

Co., Saint Louis, MO, USA) na cultura primária, e 10% SFB inativado nas subculturas.

4.2.2. Subcultura dos Fibroblastos

A subcultura, ou repique, foi realizada quando a confluência celular atingiu aproximadamente 80% na placa de Petri. Para a realização do repique, o meio de cultura foi aspirado e os fragmentos de pele, removidos com pinças. A placa contendo fibroblastos foi então lavada rapidamente com Versene (PBS com 0,05 M EDTA - *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*, Ácido Etileno Diamino Tetra Acético, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). O Versene foi cuidadosamente aspirado e posteriormente foi adicionado à placa de Petri 1 ml de tripsina 0,25% com EDTA 0,02%. A placa foi então mantida por 1-2 minutos na estufa umidificada a 37°C, e 5% CO₂ e em seguida levada ao microscópio para confirmação do desprendimento dos fibroblastos, que, nesse ponto, devem se encontrar sob forma esférica, em suspensão. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com a adição de 5,0 ml de meio DMEM com 10% SFB inativado.

A suspensão celular foi, então, centrifugada (100 g) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão de células precipitado, *pellet*, ressuspenso em 10 ml de meio DMEM com 10% SFB inativado. Após a ressusensão o meio foi distribuído em garrafas de cultura de 25, 75 ou 175 cm² de área de crescimento, de acordo com o número de células existentes.

Após os fibroblastos terem atingido nova confluência de 80% o repique foi realizado novamente e o volume final de meio ressuspenso foi

igualmente distribuído em duas garrafas de cultura, que foram completadas com mais 50% de meio DMEM com 10% SFB inativado.

A quantidade padrão de fibroblastos utilizada no repique em garrafas de 75 cm² foi de (1,0 x 10⁶ células), tendo sido mantidos em estufa umidificada a 37°C, e 5% CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas.

4.2.3. Banco de Células

Foi criado um estoque de células congeladas (“Banco de Células”) a partir dos fibroblastos obtidos das amostras de tecidos coletadas. Foram coletadas amostras de todos os pacientes de cada grupo, sendo três amostras por paciente do grupo Queloides (fibroblastos da região periférica e da região central do queloides, e pele adjacente) e duas amostras por paciente do grupo Controle Cicatriz (fibroblastos da cicatriz normotrófica e pele adjacente), totalizando 42 unidades amostrais. Cada unidade compreende de 6 a 10 *vials* (microtubos/criotubos com células), armazenados em tambor de nitrogênio líquido.

4.2.3.1. Congelamento das Células e Armazenamento

Na terceira passagem dos fibroblastos, procedeu-se o congelamento das células para armazenamento final em nitrogênio líquido. Esse procedimento consiste na colocação das células em uma solução de congelamento para fibroblastos composta de meio de cultura para fibroblastos com 50% SFB inativado, BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albumina Sérica Bovina, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) a 1% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), de acordo com o método descrito por Dougherty (1962), com modificações.

As células foram congeladas ao atingir confluência de 80%, tendo sido conforme descrito a seguir. A garrafa foi lavada duas vezes com PBS 1X. O PBS foi cuidadosamente aspirado e posteriormente foi adicionado 1 ml de tripsina 0,25% com EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) por garrafa de 75 cm². A garrafa foi então mantida por 2 minutos na estufa e em seguida levada ao microscópio para confirmação do desprendimento da placa dos fibroblastos, que, nesse ponto, devem se encontrar sob forma esférica por estarem em suspensão. A tripsina foi, então, neutralizada com a adição de 5,0 ml de meio DMEM com 10% SFB inativado.

A suspensão celular foi centrifugada (100g) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão de células precipitado (*pellet*), ressuspenso em 5 ml de meio DMEM. Em seguida, as células foram contadas em câmara de *Neubauer*, foi realizada nova centrifugação, e o *pellet* foi ressuspenso em solução de congelamento, em volume correspondente à concentração de 5,0 x 10⁶ a 10,0 x 10⁶ células por ml. Essas células foram transferidas para criotubos com 1 ml de suspensão contendo 5,0 x 10⁶ a 10,0 x 10⁶ células em cada tubo.

Esses criotubos foram imediatamente colocados em gelo a 4°C e transferidos para o congelador a -20°C, onde permaneceram por 30-60 minutos. A seguir, foram transferidos para o congelador a -80°C, onde permaneceram por 24 horas e, finalmente, armazenados no nitrogênio líquido, onde as células são mantidas a -196°C por tempo indeterminado.

4.2.3.2. Descongelamento das Células

Os fibroblastos armazenados no Banco de Células foram descongelados na proporção de um criotubo para uma garrafa de 75 cm².

Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 ml, acrescido de 4 ml de DMEM com 10% SFB inativado. A suspensão celular foi centrifugada (100 g) por 6 minutos. O sobrenadante contendo DMSO (presente no meio de congelamento) foi desprezado e o *pellet* de células, ressuspensão em meio de cultura para fibroblastos, sendo 15 ml para garrafas de 75 cm² e 25 ml para garrafas de 150 cm².

4.3. Cultura de Fibroblastos com CGRP e SP

Os fibroblastos foram utilizados para os experimentos entre a quarta e a oitava passagem a fim de preservar suas características e evitar a influência de fatores plasmáticos ou mudanças morfológicas por senescência.

Os fibroblastos descongelados foram cultivados até a confluência de 80%, repicados e novamente cultivados até a confluência desejada para o experimento. O objetivo aqui foi expandir o número de células, obtendo no final, a partir de cada tubo descongelado, pelo menos 4 garrafas de 75 cm², sendo 2 para o grupo experimental e 2 para o grupo controle.

Para a realização dos experimentos foi adicionado ao meio de cultura do grupo experimental o neuropeptídeo CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina), o neuropeptídeo SP (Substância P) ou ambos, em concentração 10⁻⁷ M, 24h após o início da cultura para o experimento, quando as células encontravam-se em confluência de 40-50%. O tempo de exposição das células aos neuropeptídeos foi de 24 h, conforme descrito na literatura (FELDERBAUER *et al.*, 2007; BULLUT *et al.*, 2008). O grupo controle não recebeu neuropeptídeos.

4.4. Citometria de Fluxo

4.4.1. Determinação da Viabilidade Celular e das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Os padrões de distribuição do ciclo celular dos fibroblastos cultivados provenientes das diferentes regiões do quelóide (QPele, QC, QPF) foram analisadas por citometria de fluxo na terceira passagem, e os resultados são representativos de quatro experimentos independentes. Esses experimentos foram de caracterização das regiões do quelóide, não tendo envolvido a adição de neuropeptídeos.

A fração de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela quantificação de DNA pelo Iodeto de Propídeo (PI), um agente que se intercala de maneira estequiométrica, isto é, proporcional ao número de bases do DNA seguindo as disposições espaciais de acordo com a forma molecular da dupla hélice do ácido nucleico. Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica revista por NICOLETTI *et al.* (1991). As células foram centrifugadas a 200 g por 15 min em tubos cônicos de 15 ml e o *pellet* foi ressuspenso em 2 ml de etanol a 4°C. As células foram lavadas 2 vezes com 1 ml de PBS a 4°C e ressuspenso em 500 µl de PBS gelado a 4°C. Para eliminar a dupla hélice de RNA que está presente na amostra, foi adicionada enzima RNase em uma concentração de 0,5 mg/ml a 4°C por 50 min. A seguir, foi colocado 1 ml de solução contendo PI por 15 min a 4°C.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson and Co. – BD, San Jose, CA EUA) e foram analisados 10.000 eventos por amostra, cada evento correspondendo a uma célula, que, no

histograma de análise bivariada, passa pelo feixe de laser em fila indiana e é detectada. O conteúdo de DNA foi avaliado no detector FL2A e analisado em escala gráfica linear. A população celular analisada foi selecionada em histograma bivariado de área de FL2A versus largura do sinal de FL2, para eliminarem-se os agregados celulares. A análise da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, G₀/G₁,S e G₂/M foi realizada utilizando o programa *Cell Quest* versão 3.4 (BD).

A intensidade da marcação na escala linear do PI no canal FL2A refere-se à quantidade de DNA das células, desta forma as células em G₀/G₁ (2n) apresentam menor intensidade de fluorescência por apresentarem menor quantidade de DNA em comparação com as células na fase G₂/Mitose (4n). As células em apoptose apresentam uma quantidade menor de 2n localizando-se à esquerda da fase G₀/G₁, região subG₀/G₁.

4.4.1.1. Quantificação do Número de Células e Viabilidade Celular pelo Iodeto de Propídeo

Na análise por citometria de fluxo foram quantificadas as células cultivadas permeáveis ao iodeto de propídeo (PI). Foi também realizada a avaliação da viabilidade celular dessa amostra de células cultivadas.

Para marcar as células em apoptose, foi utilizada a marcação com iodeto de propídeo (PI) descrita por AMANN *et al.* (1999), que, como o brometo de etídeo (BRE), se intercala entre as bases do DNA e tem a capacidade de fluorescer quando excitado pela luz UV.

As células cultivadas foram coletadas em 1 ml de PBS e em seguida centrifugadas a 300 g e ressuspensas em 100 µl de PBS, marcadas com 5 µg/ml de PI, utilizando-se em cada amostra, 10⁶ células. As células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz e

então lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson and Co. – BD, San Jose, CA EUA).

Os resultados da citometria são apresentados em quadrantes, que representam a incorporação dos marcadores conforme o eixo:

Q1 – Células positivas para PI - Inviáveis

Q2 – Células positivas para PI e Anexina – Necrose ou morte celular tardia – Inviáveis

Q3 – Células viáveis, sem marcação

Q4 – Células positivas para Anexina - Apoptose (fosfatidil serina – indicador de apoptose)

4.5. Determinação da Atividade Celular por MTT

O sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (*3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide*) (MTT) é absorvido pelas células e reduzido em uma reação mitocôndria-dependente gerando um produto formazan. O produto se acumula dentro da célula por ser impermeável à membrana plasmática, não podendo passar através dela. Na solubilização das células, o formazan é liberado podendo ser detectado e quantificado colorimetricamente. A capacidade das células para a redução MTT fornece uma indicação da integridade e atividade mitocondrial que, por sua vez, pode ser interpretada como uma medida de viabilidade e / ou número de células. O ensaio é, portanto, adaptado para uso com culturas de células em crescimento exponencial, baseado no método de HANSEN, NIELSEN, BERG (1989), com adaptações.

A determinação da capacidade das células de reduzir MTT ao produto formazan após a exposição aos neuropeptídeos, em comparação ao controle, permitiu avaliar os efeitos positivos e/ou negativos (toxicidade relativa) dos neuropeptídeos sobre a atividade / crescimento celular. Os testes sem exposição aos neuropeptídeos permitiram a comparação da atividade celular dos diversos subgrupos em função de suas características inerentes.

Para determinação da atividade celular dos fibroblastos foi utilizada uma solução de MTT da Amresco, Solon, OH, USA. Foram semeadas 3×10^3 células em cada poço de placas de cultura (96 poços). com 90 μ l de meio DMEM suplementado com 10% SFB inativado e antibióticos (conforme descrito anteriormente). As células foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂ *overnight* (12 horas) e em seguida as drogas foram adicionadas aos poços, segundo os grupos de estudo.

Antes de iniciarmos os experimentos, foi feita uma curva de densidade, semeando-se em uma placa de 96 poços, quantidades crescentes de células, rigorosamente controladas, e em triplicatas. A placa foi mantida em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂ *overnight* (12 horas). Após esse período, o MTT foi adicionado e o ensaio prosseguiu conforme detalhado anteriormente. A tabela contendo os resultados das leituras de absorbância, médias e outros dados, assim como o gráfico de densidade correspondente estão no Apêndice 8.

4.5.1. Atividade Celular/Viabilidade por MTT Sob Ação dos Neuropeptídeos ao Longo do Tempo

Resumidamente, foram preparados 5 conjuntos de placas, contendo células em triplicatas, provenientes de pacientes diferentes e totalizando $n=3$, dos diferentes grupos e subgrupos, conforme esquematizado no quadro 2 abaixo, a fim de avaliar a ação dos neuropeptídeos sobre as células em 5 pontos ao longo do tempo, entre 4 e 24 horas após sua aplicação. Todas as placas tinham um grupo Controle (sem neuropeptídeos), grupo CGRP, grupo SP e grupo X (CGRP + SP). Todas as placas tinham pelo menos um poço vazio (sem células), contendo apenas meio de cultura, usado como branco.

QUADRO 2 – Esquema das placas para o experimento de determinação da ação dos neuropeptídeos sobre a atividade celular dos fibroblastos ao longo do tempo

QPELE				QC				QPF			
CONT	CGRP	SP	X	CONT	CGRP	SP	X	CONT	CGRP	SP	X
p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1
p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1
p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1	p1
p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2
p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2
p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2	p2
p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p4	p4	p4	p4
p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p4	p4	p4	p4
p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p3	p4	p4	p4	p4

(1) p1 a p4 - pacientes

Doze horas após semeadas as células (tempo zero do experimento), os neuropeptídeos foram adicionados a todas as placas, com exceção da placa 1, que correspondeu ao ponto inicial da curva. A esta última foi adicionado apenas o MTT no tempo zero.

O quadro 3 abaixo sumariza os passos básicos do experimento.

QUADRO 3 – Esquema das placas para o experimento de atividade celular em função do tempo de ação dos neuropeptídeos

CJ PLACAS	NEUROPEPTÍDEOS	ADIÇÃO DE MTT – horas após a adição de neuropeptídeos
1	Não houve adição	Tempo 0 ⁽¹⁾
2	No tempo zero	4 horas
3	No tempo zero	8 horas
4	No tempo zero	12 horas
5	No tempo zero	24 horas

(1) Tempo zero = 12 horas após a semeadura das células

A cada poço foram adicionados 10 µl de solução de MTT a uma concentração de 10 mg/ml em DMEM, para uma concentração final de 1 mg/ml no poço. As placas contendo MTT foram mantidas em incubadora por 4 horas a 37°C. O meio de cultura foi removido e substituído por 100 µl de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e após 10 min, as leituras de absorvância foram realizadas em leitor de microplacas SpectraMax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) em um comprimento de onda de 570 nm.

Placas de 48 poços também foram utilizadas em alguns ensaios. Nesses casos, todas as quantidades utilizadas, de células, meios, drogas ou reagentes, foram duplicadas.

4.5.2. Atividade Celular/Viabilidade por MTT Sob Ação dos Neuropeptídeos Após 24 e 48 Horas

Alguns experimentos foram feitos avaliando-se a ação dos neuropeptídeos sobre a atividade e viabilidade dos fibroblastos dos grupos Cicatriz e Queloide em 2 momentos distintos, 24 e 48 horas após sua aplicação. Para tal, foram preparadas placas separadas, idênticas, sendo um conjunto de placas avaliado 24 horas após a adição de neuropeptídeos ao meio, e o outro conjunto, 48 horas após. Os experimentos foram feitos sempre em triplicatas, e todas as placas tinham um grupo Controle (sem neuropeptídeos), grupo CGRP, grupo SP e grupo X (CGRP + SP). As densidades ópticas foram registradas para cada poço a 570 nm e corrigidas em relação ao branco. Para avaliar os efeitos dos neuropeptídeos sobre as células, foi calculado o percentual de viabilidade celular dos subgrupos tratados, expresso como:

$$\frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{absorbância das células controle}} \times 100\%$$

Os itens 4.5.1 e 4.5.2 não se caracterizam como objetivos específicos deste trabalho, e sim como experimentos relacionados e pertinentes ao estudo, uma vez que as investigações utilizando neuropeptídeos, segundo nossos objetivos, visavam especificamente a expressão do gene p53 e do índice apoptótico em culturas de fibroblastos de queiloide. Entretanto, por serem diretamente relacionados aos demais experimentos, foram considerados objetivos secundários, e por esse motivo, mantidos no corpo da tese.

4.5.3. Atividade Celular por MTT dos Fibroblastos de Queloide e Cicatriz ao Longo do Tempo

Uma vez obtidos os resultados da ação dos neuropeptídeos sobre a atividade celular dos fibroblastos, outros experimentos similares foram realizados sem a adição de neuropeptídeos ao meio de cultura, a fim de investigar a atividade celular dos fibroblastos de queloide ao longo do tempo. A metodologia utilizada foi a mesma descrita acima para os grupos controle.

4.6. Análise Quantitativa de Células em Apoptose por

Espectrofotometria

Os ensaios de espectrofotometria para p53 e Caspase-3 foram realizados utilizando-se os seguintes anticorpos:

- Anticorpo primário anti-P53 clivada, produzido em coelho (p-p53, sc-101762, 100 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

- Anticorpo primário anti-Caspase-3 clivada, produzido em coelho (Asp175, #9664s, 100 µg/ml, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA).

- Anticorpo secundário marcado com HRP (*Horseradish Peroxidase*, Peroxidase de Raiz-Forte), produzido em cabra, anti-coelho (IgG, HRP-conjugate, 12-348, Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

- Anticorpo secundário marcado com TRITC, produzido em cabra, anti-coelho (IgG-TRITC, T6778, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

As leituras de fluorescência ou luminescência foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA,

USA) em comprimento de onda específico, segundo a metodologia descrita a seguir, originalmente sugerida juntamente com as especificações dos anticorpos secundários, e totalmente adaptada por nós.

A. Soluções e Reagentes

1. PBS com pH ajustado para 7,4;
2. Tampão de Lavagem: Saponina 0,01% em PBS;
3. Tampão de Diluição de Anticorpo Primário: 1mg/ml BSA em Tampão de Lavagem com Saponina;
4. Tampão de Diluição de Anticorpo Secundário: 1% BSA em Tampão de Lavagem com Saponina;
5. Solução de Leitura para HRP: misturar partes iguais de Luminol/Solução Intensificadora (*Enhancer Solution*) e Tampão Peróxido Estabilizado (Kit No. WBKL S01 00, Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

As soluções, quando preparadas com antecedência, foram mantidas congeladas, sendo descongeladas em geladeira na véspera do experimento para evitar a proliferação de fungos.

B. Fixação das Células

Os meios de cultura foram aspirados dos poços e as células foram fixadas com etanol 70%, à temperatura ambiente, por 10 minutos, adicionando-se 100 µl de etanol a cada poço em placas de 96 poços e 200 µl em placas de 48 poços. O etanol foi aspirado, e a placa foi lavada 2 vezes com Tampão de Lavagem.

C. Anticorpo Primário

As diluições para os anticorpos primários foram definidas em testes pilotos. Para os ensaios utilizando-se anti-caspase-3 clivada, a diluição escolhida foi de 1:5000. Já para o anti-p53, a diluição escolhida foi 1:500. Os anticorpos primários foram

diluídos em Tampão de Diluição de Anticorpo Primário, e adicionou-se 100 µl de solução contendo anticorpos a cada poço em placas de 96 poços e 200 µl em placas de 48 poços. As placas foram, então, incubadas por 4 horas a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes utilizando-se o Tampão de Lavagem.

D. Anticorpo Secundário marcado com HRP ou com TRITC

As diluições para os anticorpos secundários marcados com HRP ou com TRITC foram definida em testes pilotos, tendo sido escolhida 1:5000, ou 1:1000, segundo o experimento. Os anticorpos secundários foram diluídos em Tampão de Diluição de Anticorpo Secundário, e adicionou-se 100 µl de solução contendo anticorpos a cada poço em placas de 96 poços e 200 µl em placas de 48 poços. As placas foram, então, incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes utilizando-se o Tampão de Lavagem.

Ensaio de Quimioluminescência com HRP

E. Leitura

Adicionou-se 100 µl de Solução de Leitura para HRP a cada poço em placas de 96 poços e 200 µl em placas de 48 poços imediatamente antes de se proceder à leitura das placas. As placas foram lidas no espectrofotômetro SpectraMax M2e citado acima, na função luminômetro, para medir Unidades Relativas de Luz (*Relative Light Units* – RLU), a 425 nm, nos 10 minutos que se seguiram à adição do substrato (Solução de Leitura para HRP), já que a intensidade ótima do sinal é obtida quando a leitura é feita nesse intervalo de tempo.

Ensaio de Imunofluorescência com TRITC

F. Leitura

O TRITC não precisa de substrato enzimático para ser revelado, e o PBS foi utilizado PBS como solução de leitura. Adicionou-se, então, 100 µl de PBS a cada poço em placas de 96 poços e 200 µl em placas de 48 poços imediatamente antes de se proceder à leitura das placas. As placas foram lidas no espectrofotômetro SpectraMax M2e descrito acima, na função fluorômetro, para medir Unidades Relativas de Luz (*Relative Light Units* – RLU), ajustado nos valores de Excitação a 541 nm e Emissão a 572 nm, nos 10 minutos que se seguiram à adição do PBS.

4.7. Microscopia de Fluorescência

4.7.1. Citoquímica e Imunocitoquímica por Microscopia de Fluorescência

Para os ensaios de detecções citoquímicas e imunocitoquímicas, 10^3 fibroblastos provenientes das diferentes regiões do queloide foram semeados sobre lamínulas circulares de 12 mm^2 , cada lamínula tendo sido acondicionada em um poço de placa de 24 poços, mantida em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 48 horas. O meio foi aspirado e os poços lavados com PBS e as células foram fixadas com formol 0,4% em PBS e mantidas a 4°C até o momento do experimento.

A marcação das células com os marcadores e corantes fluorescentes foi feita de acordo com o método descrito por BKAILY *et al.* (1996) com

adaptações. Os dados dos fluoróforos utilizados estão no quadro 04 a seguir.

As lamínulas contendo as células foram observadas no microscópio de fluorescência confocal da Carl Zeiss LSM 510, objetiva 40X ou 100X com abertura numérica 1,4 a óleo. Sendo possível a análise com excitação envolvendo quatro lasers simultaneamente, são eles: laser de Argônio (488 nm), Hélio/Neônio-1 (543 nm), Hélio/Neônio-2 (633 nm) e o Titânio/safira (750 nm). Foram também utilizados os respectivos filtros de interferência para os fluoróforos utilizados, a fim de se obter os comprimentos de onda de emissão e as imagens na profundidade do plano focal, que foram obtidas combinando as fatias ópticas projetadas dos eixos x-y.

Foi realizada a varredura linear das células a cada 3 segundos de acordo com a velocidade do *scanner*, ainda dependendo do número de fatias. A visualização e obtenção das imagens foi feita por meio do microscópio de fluorescência acoplado a um computador cujo programa de aquisição e análise de imagens permite a criação de imagens em 3D.

4.7.2. Imunocitoquímica

Inicialmente o formol foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com PBS, uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina e duas vezes em PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo primário, na diluição descrita abaixo, em PBS contendo 1% de Albumina Sérica Bovina - BSA por 45 min. Ao final da incubação, as células foram lavadas por duas vezes em PBS, uma vez em PBS com 1% BSA e novamente em PBS por mais duas vezes. A seguir, as células foram incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (verde) ou 594

(vermelho) conjugados com faloidina (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), diluídos 1:50 (25 µg/ml), em PBS, corados com DAPI (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) e MitoTracker Green/Red (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA), também em PBS (2% BSA). Após 30 min de incubação, as células foram lavadas cinco vezes em PBS e montadas sobre lâminas de vidro. As células fixadas e marcadas foram observadas no microscópio confocal.

QUADRO 4 – Dados de indicadores e sondas fluorescentes utilizados nos ensaios de microscopia confocal

Indicador/sonda fluorescente	1.1.1 Aplicação	EX máx. (nm)	EM máx. (nm)	Laser de Ar/Kr, He/Ne e titânio/safira em nm
DAPI	Indicador de ácido nucleico	374	430-640	UV ou filtro (“UV longpass”)
FITC	(Fluoresceína) utilizada em sondas fluorescentes	494	520	488
MitoTracker Red®	Sonda para mitocôndrias	579	599	543
MitoTracker Green®	Sonda para mitocôndrias	490	516	
PI	Corante para ácidos nucleicos		599	UV ou filtro (“UV longpass”)

4.8. Método Estatístico

Todos os dados coletados foram comparados entre si e submetidos a análise estatística.

Os parâmetros de análise foram representados como valores médios ou como porcentagem de aumento relativo ao controle. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de Anova seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls ou pelo teste de Bonferroni. Em todos os testes se fixou em 5% ($p < 0,05$) o nível de rejeição de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

A análise do histograma em citometria de fluxo foi realizada quantificando a porcentagem das regiões M1 e M2 utilizando-se o programa *Cell Quest* (versão 3.4 BD). Uma vez delimitada uma região de análise, o programa calcula a média dos eventos da escala linear mediante a fórmula:

$$\text{Media} = \frac{\sum X_i}{n}$$

onde X_i é o valor linear dos eventos e n é o número de eventos usados nos cálculos.

5. RESULTADOS

5.1. Banco de Células

Foi criado um estoque de células congeladas (“Banco de Células”) a partir dos fibroblastos obtidos das amostras de tecidos coletadas. Foram coletadas amostras de todos os pacientes de cada grupo, sendo três amostras por paciente do grupo Queloides (fibroblastos da região periférica - QPF e da região central do queloides - QC, e pele adjacente - QPele) e duas por paciente do grupo Controle Cicatriz (fibroblastos da cicatriz normotrófica - CC e pele adjacente - CP), totalizando 42 unidades amostrais. Cada unidade compreende de 6 a 10 *vials* (microtubos com células), armazenados em tambor de nitrogênio líquido.

As células congeladas foram testadas após pelo menos um mês de congelamento. Nessa ocasião, um *vial* de cada amostra criopreservada foi descongelado e as células, colocadas em cultura a fim de assegurar que as amostras congeladas não estivessem inviáveis (células mortas) devido a alguma falha no processo de congelamento.

5.2. Cultura de Fibroblastos com CGRP e SP

A concentração de neuropeptídeos utilizada foi padronizada em experimentos-piloto (Apêndice 4). Não tendo sido detectadas diferenças entre as concentrações testadas, a concentração 10^{-7} M de CGRP e SP, foi então escolhida para ser utilizada nos experimentos.

O tempo de exposição das células aos neuropeptídeos foi de 24 h. Assim, 24 h após o início da cultura, o meio foi trocado por meio +

neuropeptídeos na concentração 10^{-7} M, permanecendo por 24 h. As garrafas dos grupos controle (sem adição de neuropeptídeos) também tiveram o meio trocado.

Em seguida, o meio foi retirado e as células foram tripsinizadas, contadas e submetidas a Citometria de Fluxo para determinação da viabilidade celular e taxas de apoptose e necrose utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo.

Procedimento similar foi executado em placas de 96 ou 48 poços, para os demais experimentos analisados por espectrofotometria. Tal procedimento será detalhado nos itens respectivos aos experimentos específicos.

5.3. Citometria de Fluxo

5.3.1. Determinação da Viabilidade Celular e das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

5.3.1.1. Análise da Distribuição do Ciclo Celular

A distribuição do ciclo celular foi medida quantitativamente pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (figura 4A). Uma comparação entre os grupos é mostrada como o percentual de células nas fases G_0 - G_1 (M2) e G_2 -M/S (M3) em cada grupo (figura 4B e C). No que diz respeito ao índice mitótico, nossos dados mostraram aproximadamente 60% dos fibroblastos do subgrupo QPF distribuídos nas fases G_2 -M/S (M3), enquanto apenas cerca de 41% dos fibroblastos dos subgrupos QC e QPele encontravam-se nessas fases proliferativas, sem diferenças

significantes entre os dois últimos grupos. Em contraste, a maioria dos fibroblastos dos subgrupos QC e QPele encontrava-se distribuída na fase G_0 - G_1 (~58%). Assim, não há diferenças significantes na distribuição do ciclo celular entre os fibroblastos da região periférica (QPF) e os fibroblastos tanto da pele adjacente ao queuloide (QPele) quanto da região central do queuloide ($p < 0,05$) (figura 4B). Por outro lado, o índice apoptótico dos fibroblastos da pele adjacente estava significativamente mais elevado (~2%) do que o dos fibroblastos da região central (~0,9%) e periférica (~1%) do queuloide, sem diferenças significantes entre os dois últimos (figura 4C).

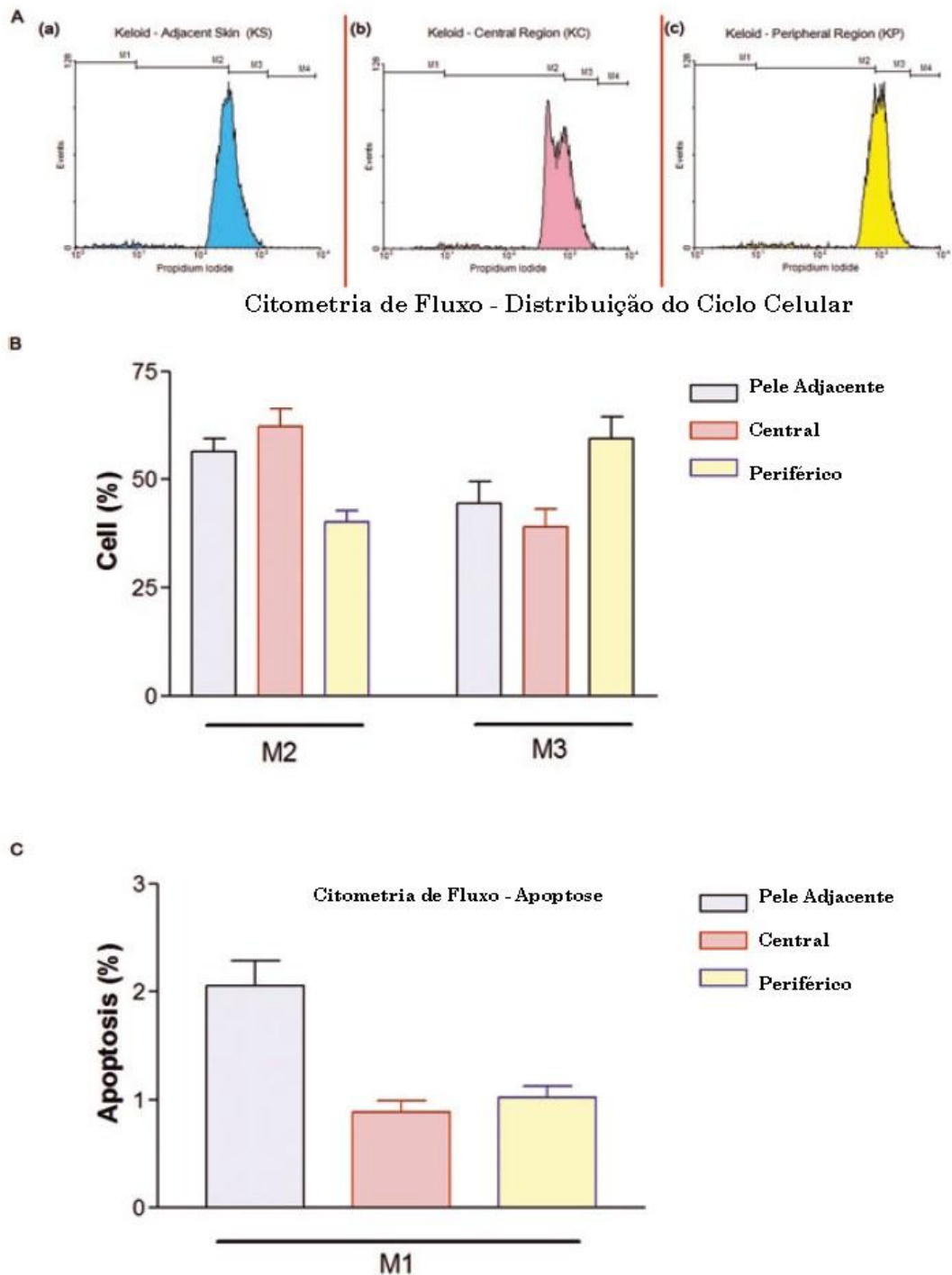


FIGURA 4 – Citometria de fluxo. (A) Análise do ciclo celular de um dos experimentos do grupo queloide controle (sem adição de neuropeptídeos), mostrando os diferentes perfis entre os grupos. M1: células apoptóticas; M2: fase G0-G1; M3: fases M/S. Fibroblastos provenientes de: (a) pele adjacente ao queloide; (b) região central; (c) região periférica. (B) Distribuição quantitativa do ciclo celular. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido por Newman-Keuls (nível de significância

$p < 0,05$). (B e C) Os valores representam a média \pm erro padrão de pelo menos quatro diferentes experimentos.

5.3.2. Quantificação do Número de Células e Viabilidade Celular pelo Iodeto de Propídeo

Foram testadas interações entre as células do Grupo Quelóide provenientes de três pacientes ($n=3$), e células do Grupo Cicatriz Normotrófica provenientes de dois pacientes ($n=2$), com os neuropeptídeos CGRP, SP e ambos. Os testes foram realizados em duplicatas. Os resultados nos gráficos e quadros típicos da citometria (anexina X PI) apresentam-se divididos em quadrantes, que representam a incorporação dos marcadores conforme o eixo:

Q1 – Células positivas para PI – Inviáveis

Q2 – Células positivas para PI e Anexina – Necrose ou morte celular tardia – Inviáveis

Q3 – Células sem marcação de PI ou Anexina – Viáveis

Q4 – Células positivas para Anexina – Apoptose

No Apêndice 10 encontram-se os resultados completos de um experimento de cada grupo, com os gráficos obtidos na citometria.

A viabilidade celular foi medida quantitativamente pela análise de incorporação dos corantes Anexina e PI em três experimentos. A figura 5 mostra a comparação dos índices apoptóticos apenas entre os subgrupos controle do grupo quelóide. Pode-se notar que o índice apoptótico dos fibroblastos da pele adjacente ao quelóide encontrava-se significativamente

mais elevado (~3,2%) do que o dos fibroblastos da região central (~2,3%) e periférica (~2,1%) do queiloide, sem diferenças significantes entre os dois últimos. Esses dados estão de acordo com os encontrados em experimento anterior, nos ensaios de Ciclo Celular (figura 4C).

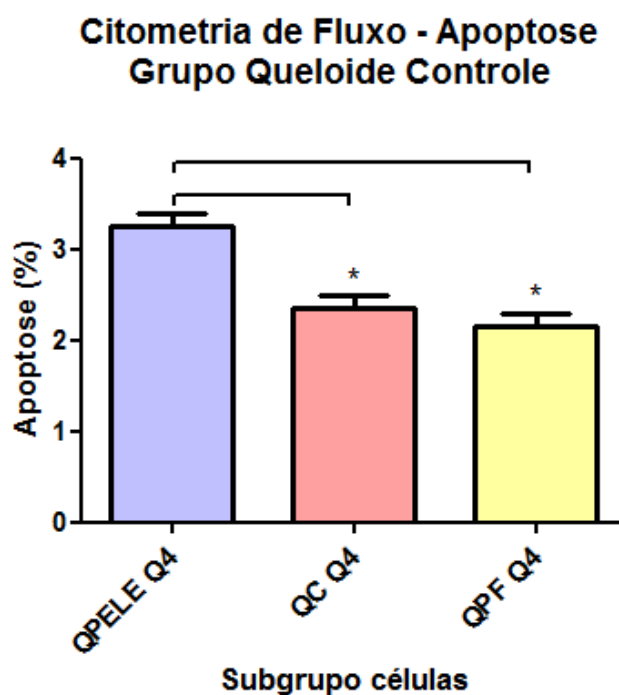


FIGURA 5 – Citometria de fluxo - Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queiloide Subgrupo Controle. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados de três experimentos. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (nível de significância: $p < 0,05$) *: $p < 0,05$.

O percentual de células viáveis em cada subgrupo, sob a ação dos neuropeptídeos, está demonstrado abaixo (figura 6A). Não houve diferença

significante no percentual de células viáveis em qualquer dos subgrupos, com ou sem adição de neuropeptídeos. A média de células viáveis para todo o grupo foi de 91,6%.

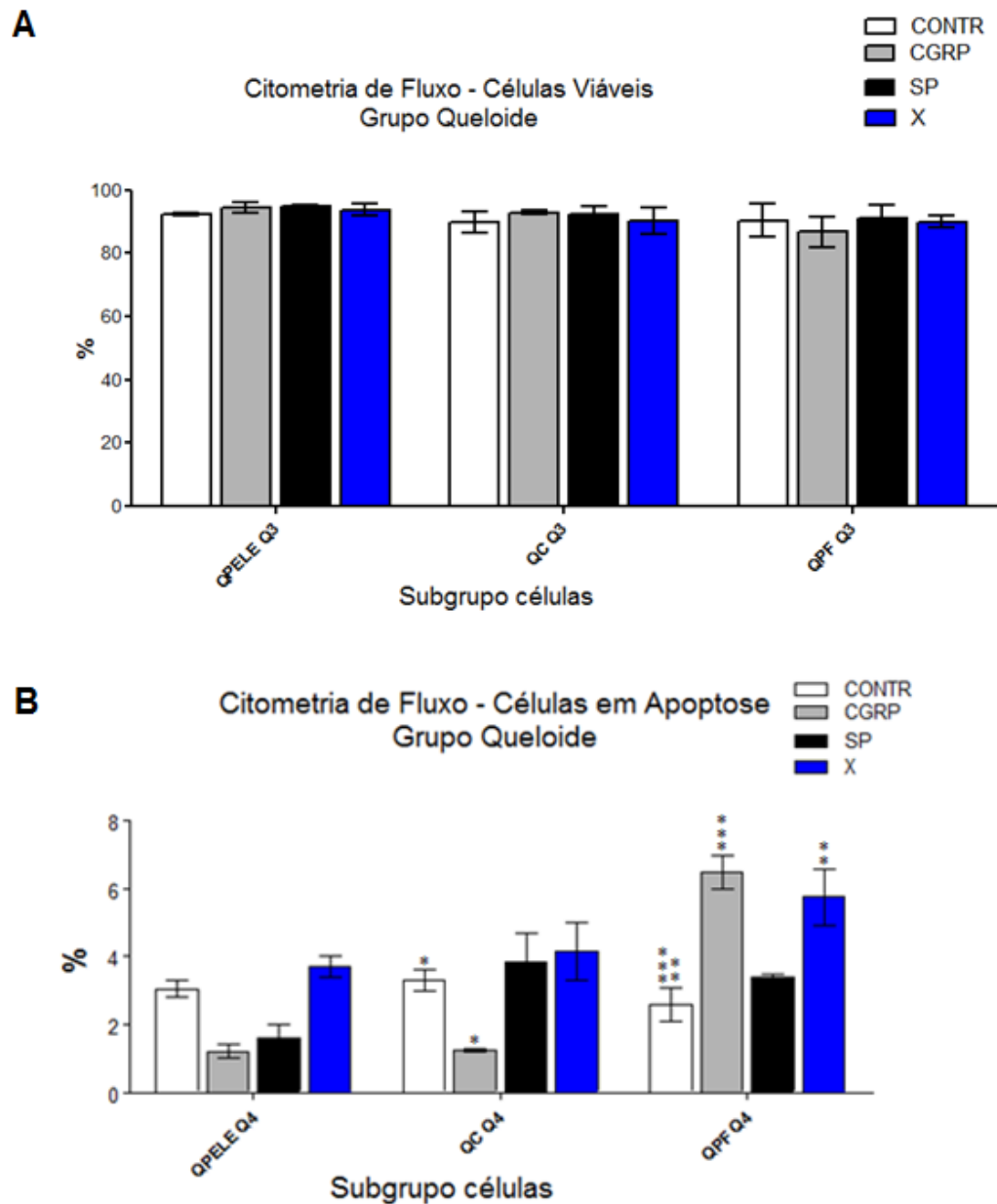


FIGURA 6 – Citometria de Fluxo - Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queiloide. (A) Células viáveis. (B) Células em apoptose. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados de três experimentos. Dados analisados utilizando-se 2-way

Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$) *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

A figura 6B mostra a comparação dos índices apoptóticos entre os subgrupos do grupo queloide, sob ação dos neuropeptídeos. As comparações dentro de cada subgrupo foram feitas em relação ao controle. No subgrupo QPele, embora a adição de neuropeptídeos tenha provocado alguma mudança no perfil apoptótico das células, essas alterações não foram significantes. Já no subgrupo QC, a adição de CGRP provocou uma diminuição significativa do índice apoptótico (~1,2%) em relação ao controle (~2,3%). No subgrupo QPF, a adição de CGRP ao meio de cultura, por outro lado, provocou uma elevação significativa do índice apoptótico (~6,0%) em relação ao controle (~2,1%), o mesmo ocorrendo quando da adição de CGRP + SP (~5,7%).

5.4. Determinação da Atividade Celular por MTT

5.4.1. Atividade Celular/Viabilidade por MTT dos Fibroblastos de Queloide e Cicatriz Sob Ação dos Neuropeptídeos Após 24 Horas e 48 Horas

Não houve alteração significativa na atividade celular devido à adição de neuropeptídeos, 24 ou 48 horas após sua aplicação, nos subgrupos celulares do Grupo Queloide ou do Grupo Cicatriz em relação aos respectivos controles, como podemos verificar na figura 7 abaixo, representativa dos experimentos. Os experimentos foram repetidos 3 vezes

com células de mais pacientes, totalizando n=3 para o Grupo Cicatriz e n=4 para o Grupo Queloides, sempre com os mesmos resultados.

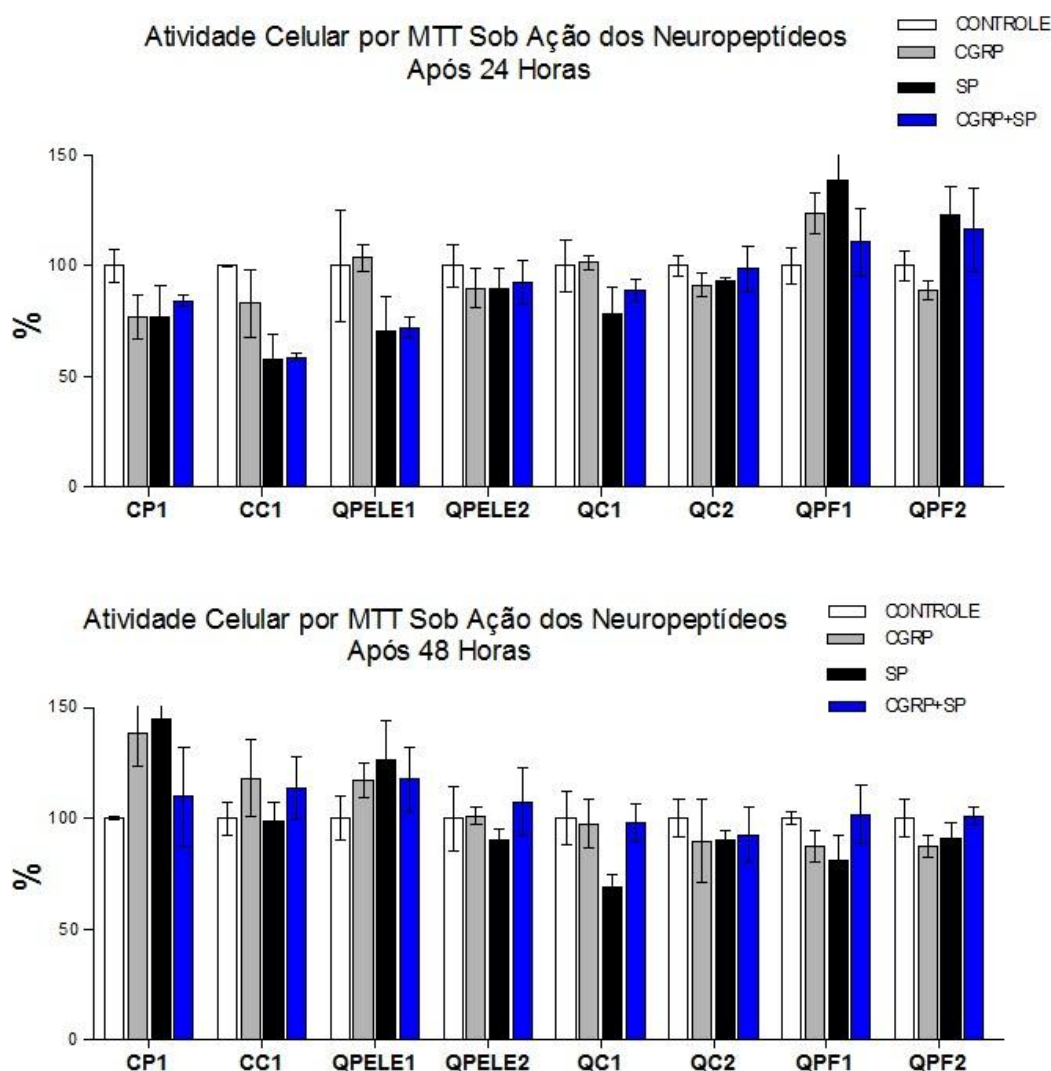


FIGURA 7 – Atividade celular por MTT sob ação dos neuropeptídeos após 24 e 48 horas. Grupo Cicatriz (CP, CC) e Grupo Queloides (QPele, QC, QPF). Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (C) (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células, semeadas em triplicata. (A) e (B) ilustram dois experimentos isolados e semelhantes. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos.

5.4.2. Determinação da Ação dos Neuropeptídeos Sobre a Atividade Celular dos Fibroblastos de Queloide ao Longo do Tempo.

Não houve alteração na atividade celular ao longo do tempo, devido à adição de neuropeptídeos, entre 4 e 24 horas após sua aplicação, nos subgrupos celulares do Grupo Queloide como podemos verificar na figura 8 abaixo.

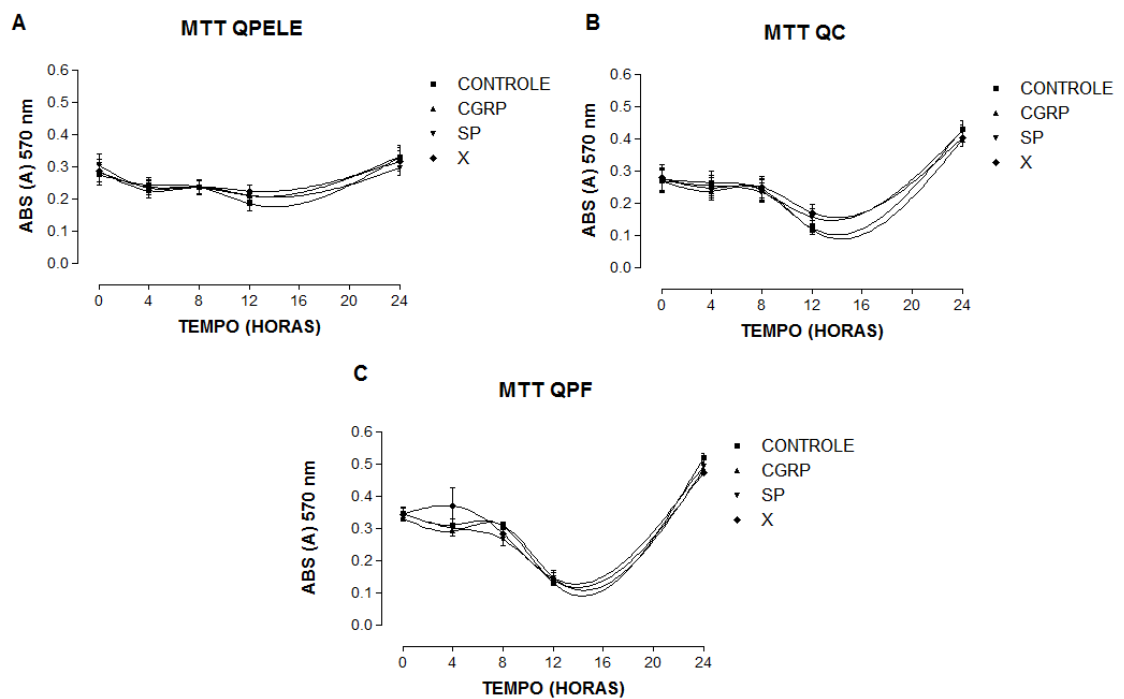


FIGURA 8 – Atividade Celular por MTT Sob Ação dos Neuropeptídeos ao Longo do Tempo. Grupo Queloide. (A) QPele. (B) QC. (C) QPF. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 3 pacientes diferentes ($n=3$), semeadas em triplicata.

Entretanto, foi observado um padrão de atividade celular ao longo do tempo, segundo o subgrupo celular considerado. Esse padrão mostrou-se consistente, e os dados foram estatisticamente significantes.

Os testes foram repetidos, com determinação da atividade celular nos sete pontos do gráfico (incluindo os pontos 16 e 20 horas), para confirmação do padrão de atividade celular ao longo do tempo segundo o subgrupo celular, sem adição de neuropeptídeos, visto que não fizeram nenhum efeito. Nos novos experimentos, o “n” também foi igual a 3, e as células foram semeadas sempre em triplicatas. Foi incluído o grupo de células 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo) a título comparativo por se tratar de linhagem celular de referência.

Os resultados estão relatados a seguir, no item 5.4.3.

5.4.3. Atividade Celular por MTT de Fibroblastos de Queloide ao Longo do Tempo.

5.4.3.1. Primeiro Experimento: Fibroblastos de Queloide e 3T3

Este experimento deveria ter sido conduzido utilizando-se todas as células do grupo queloide e, como comparação, fibroblastos 3T3. Entretanto, o subgrupo QC que estava sendo cultivado para o experimento apresentou problemas no dia do procedimento e não houve tempo hábil para sua substituição. Como possuíamos células excedentes do subgrupo QPF, de outro paciente, demos prosseguimento ao experimento sem o subgrupo QC, e com 2 subgrupos QPF, uma vez que já dispúnhamos de dados preliminares para comparação, e cientes de que faríamos outros

experimentos mais completos, possibilitando a utilização dos dados aqui obtidos.

Os dados deste experimento encontram-se detalhados na figura 9 a seguir.

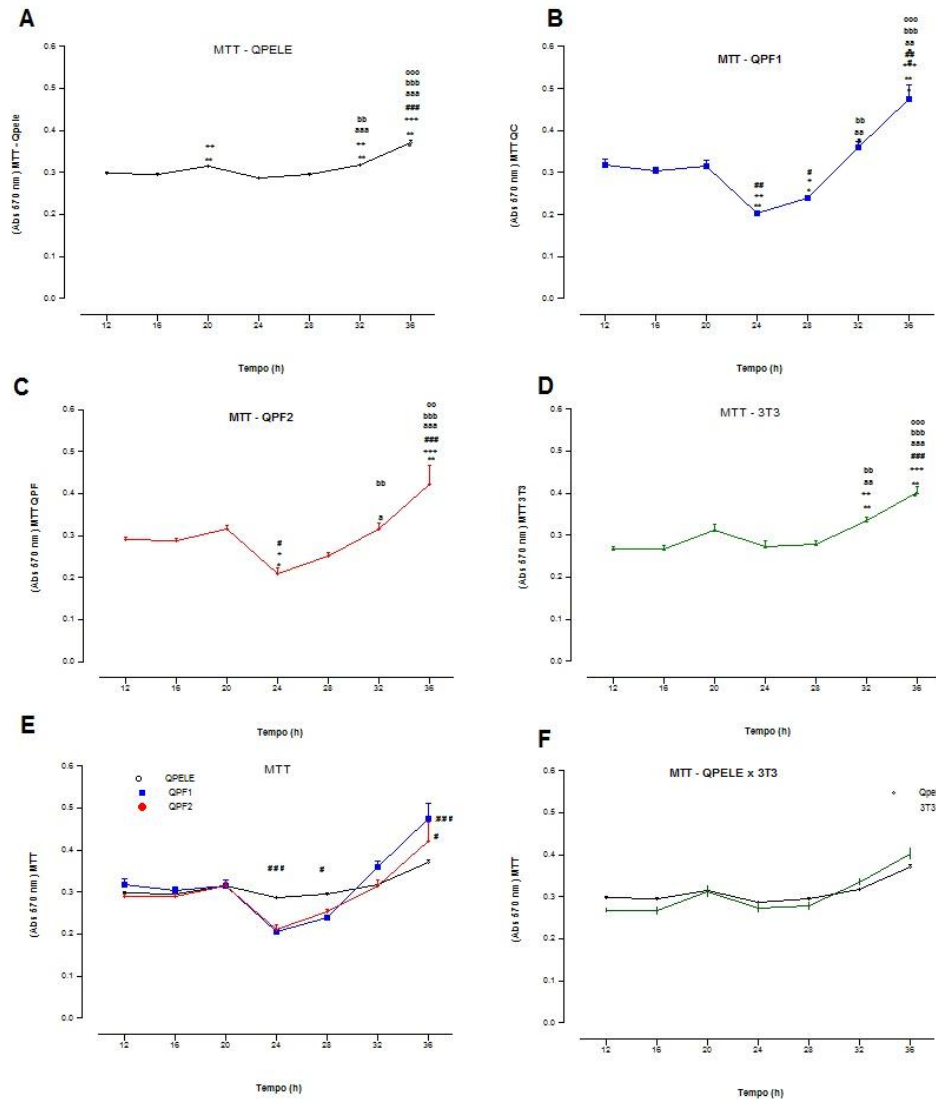


FIGURA 9 – Atividade Celular por MTT ao Longo do Tempo. Grupo Queiloide x 3T3 (A) QPele. (B) QPF1. (C) QPF2. (D) 3T3. (E) QPele x QPF. (F) QPele x 3T3. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-D) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (E-F, sem marcação nos gráficos) (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores

representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente (n=1),
semeadas em triplicata.

As variações observadas para a figura 14, (A) a (D) foram:

** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ vs 12 horas

(++) $p < 0,01$ ou (++) $p < 0,001$ vs 16 horas

$p < 0,001$ vs 20 horas

aaa $p < 0,001$ vs 24 horas

bb $p < 0,01$ ou bbb $p < 0,001$ vs 28 horas

ccc $p < 0,001$ vs 32 horas.

(E) e (F) são sobreposição de curvas para fins comparativos. Os testes 2-way Anova, seguidos do pós-teste de Bonferroni para (E) e (F), nas comparações entre as curvas mostraram em (E) que a curva QPele apresentou diferença significativa quanto à atividade ($p < 0.001$) em relação a QPF1 e QPF2 no ponto 24 horas, e QPF2 no ponto 36 horas e significativa ($p < 0.05$) em relação a QPF1 e QPF2 no ponto 28 horas. As curvas QPF1 e QPF2 não apresentaram diferenças significantes entre si. Em (F), as curvas QPele e 3T3 não apresentaram diferenças significantes entre si.

5.4.3.2. Segundo Experimento: Fibroblastos de Queloides

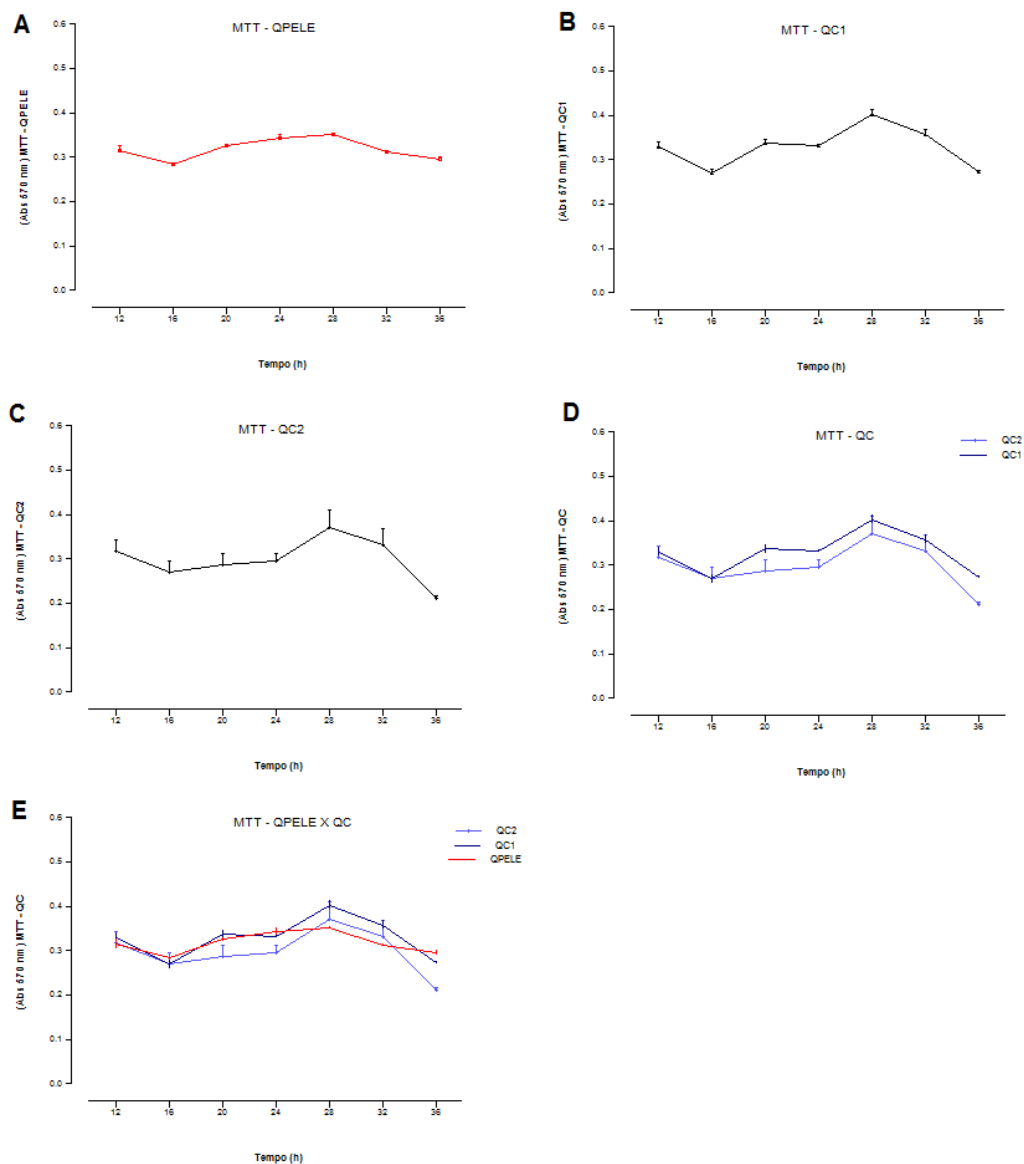


FIGURA 10 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Queloides – QPele e QC. (A) QPele. (B) QC1. (C) QC2. (D) QC1 x QC2. (E) QPele x QC. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-C) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (D-E) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente ($n=1$) em cada curva, semeadas em triplicata. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos.

Na figura 10A, todos os pontos apresentaram diferenças significantes entre si com exceção de: 16 vs 36; 36 vs 12; 36 vs 32; 32 vs 20; 32 vs 12; 12 vs 20; 20 vs 24; 24 vs 28 horas.

Na figura 10B, todos os pontos apresentaram diferenças significantes entre si com exceção de: 12 vs 20; 12 vs 24; 12 vs 32; 16 vs 36; 20 vs 32; 24 vs 20; 24 vs 32 horas.

Na figura 10C, apenas os pontos 36 vs 28 horas apresentaram diferenças significantes entre si.

As figuras 10D e 10E mostra a sobreposição das curvas para fins comparativos. Embora o perfil das curvas seja visivelmente distinto segundo o subgrupo celular, os testes 2-way Anova, seguidos do pós-teste de Bonferroni para essas figuras não apontaram diferença significativa ($p < 0.05$) entre as curvas em nenhum dos pontos analisados.

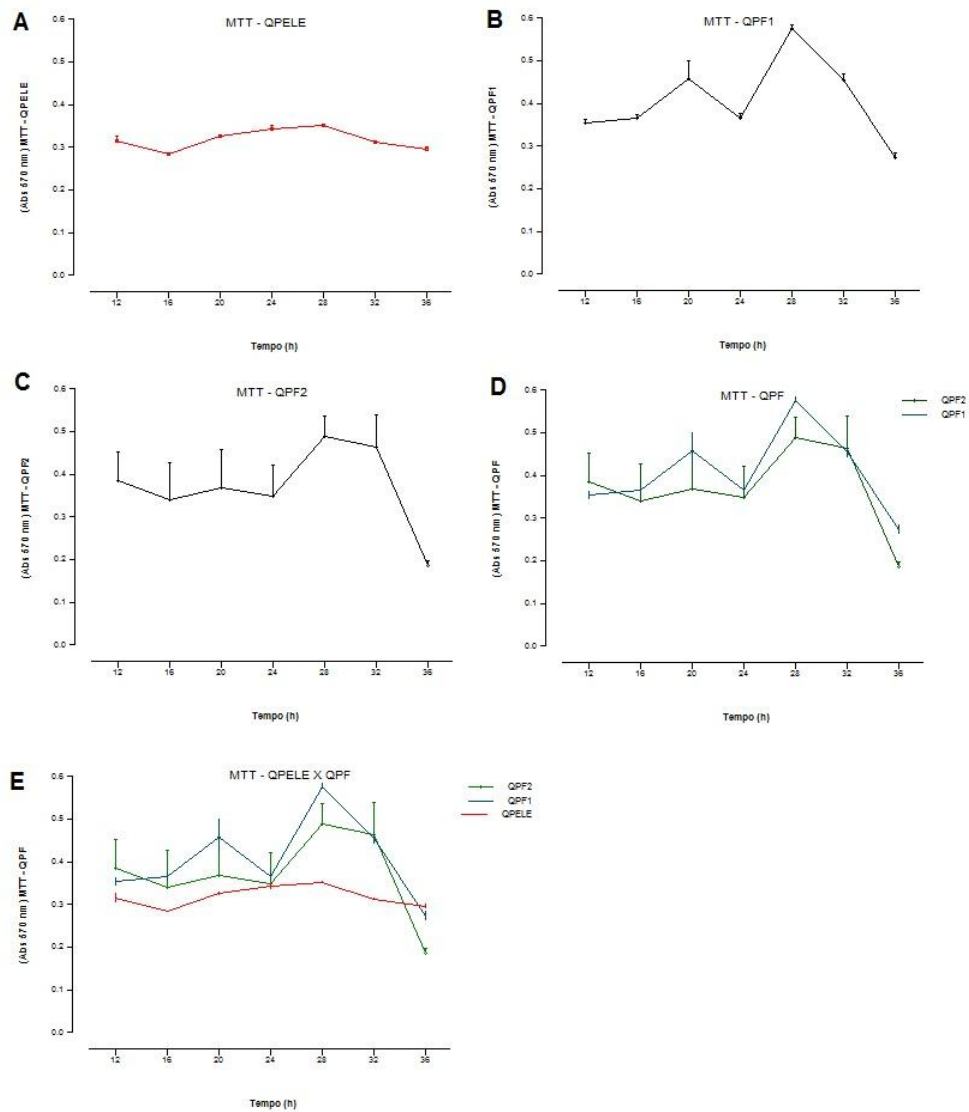


FIGURA 11 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Quelóide – QPele e QPF. (A) QPele. (B) QPF1. (C) QPF2. (D) QPF1 x QPF2. (E) QPele x QPF. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-C) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (D-E) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente ($n=1$) em cada curva, semeadas em triplicata. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos.

A figura 11A já foi analisada acima (corresponde à figura 10A).

Na figura 11B, todos os pontos apresentaram diferenças significantes entre si com exceção de: 12 vs 24; 12 vs 16; 16 vs 24; 32 vs 20 horas.

Na figura 11C, não houve diferenças significantes entre os pontos.

As figuras 11D e 11E mostra a sobreposição das curvas para fins comparativos. As duas curvas QPF sobrepostas (11D) não apresentaram diferenças significantes entre si. Em 11E, quando comparadas à curva de QPele (11E), o ponto 28 horas apresentou uma diferença significativa ($p < 0.01$) na atividade em relação a QPF1.

Foi conduzido um experimento utilizando-se fibroblastos de cicatriz normotrófica. Por ter sido realizado apenas uma vez, foi considerado um resultado preliminar, precisando ser repetido para confirmação. Os resultados desse experimentos estão no Apêndice 11.

5.5. Análise Quantitativa de Células em Apoptose por

Espectrofotometria

Os resultados para um dos ensaios de espectrofotometria utilizando anticorpos anti-p53 e anti-caspase-3 para os diversos subgrupos celulares, após tratamento de 24 horas com neuropeptídeos CGRP, SP e ambos, na concentração 10^{-7} M, estão demonstrados abaixo.

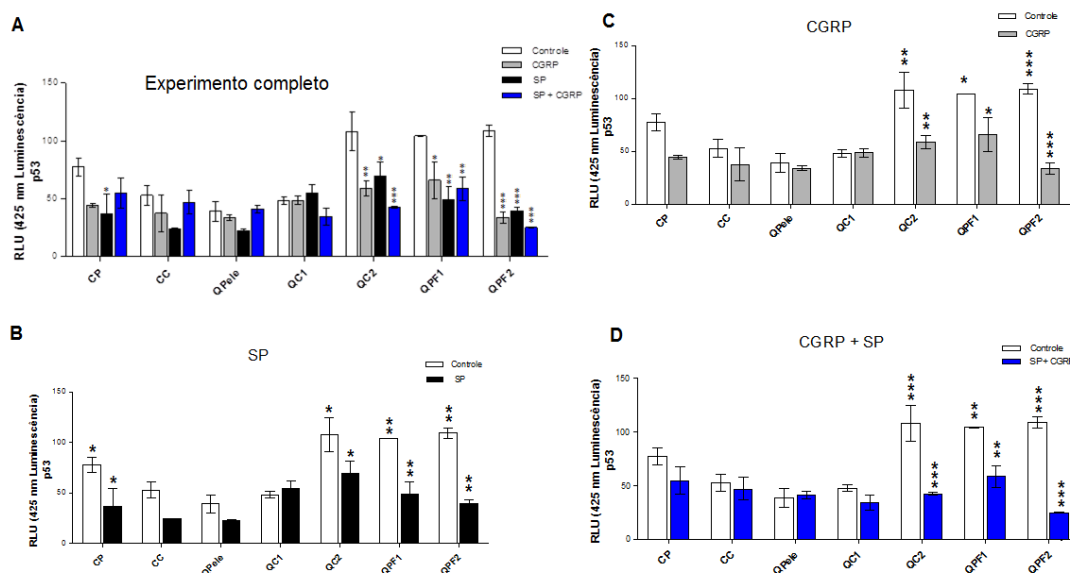
Expressão de p53 em Fibroblastos de Queleide e de Cicatriz Normotrófica Sob a Ação dos Neuropeptídeos CGRP e SP
Luminescência - HRP

FIGURA 12 – Espectrofotometria de luminescência com HRP. Expressão de p53 em fibroblastos de queleide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos. (A) Experimento completo. (B) Controle. (C) Controle x CGRP. (D) Controle x SP. (E) Controle x CGRP+SP. (B) Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam diferentes pacientes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. RLU: Unidades Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Analisando-se a expressão de p53 em fibroblastos de queleide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos por espectrofotometria de luminescência com HRP (figura 12), percebe-se que na maior parte dos subgrupos celulares, a expressão de p53 é sempre mais elevada nos controles, em relação às células tratadas com neuropeptídeos. Em todos os subgrupos (com exceção de QC1), a adição de neuropeptídeos, seja CGRP, SP ou ambos, provocou uma diminuição na expressão de p53, sendo que

nos subgrupos de fibroblastos de queleide (QC2, QPF1 e QPF2), em todos os casos, essa diminuição foi estatisticamente significativa em relação ao controle. SP, isoladamente, provocou ainda a diminuição da expressão de p53 de forma significativa também no grupo CP, nesse experimento.

As diferenças de expressão de p53 segundo o subgrupo celular, no grupo controle, foram analisadas separadamente e estão ilustradas na figura 13A abaixo.

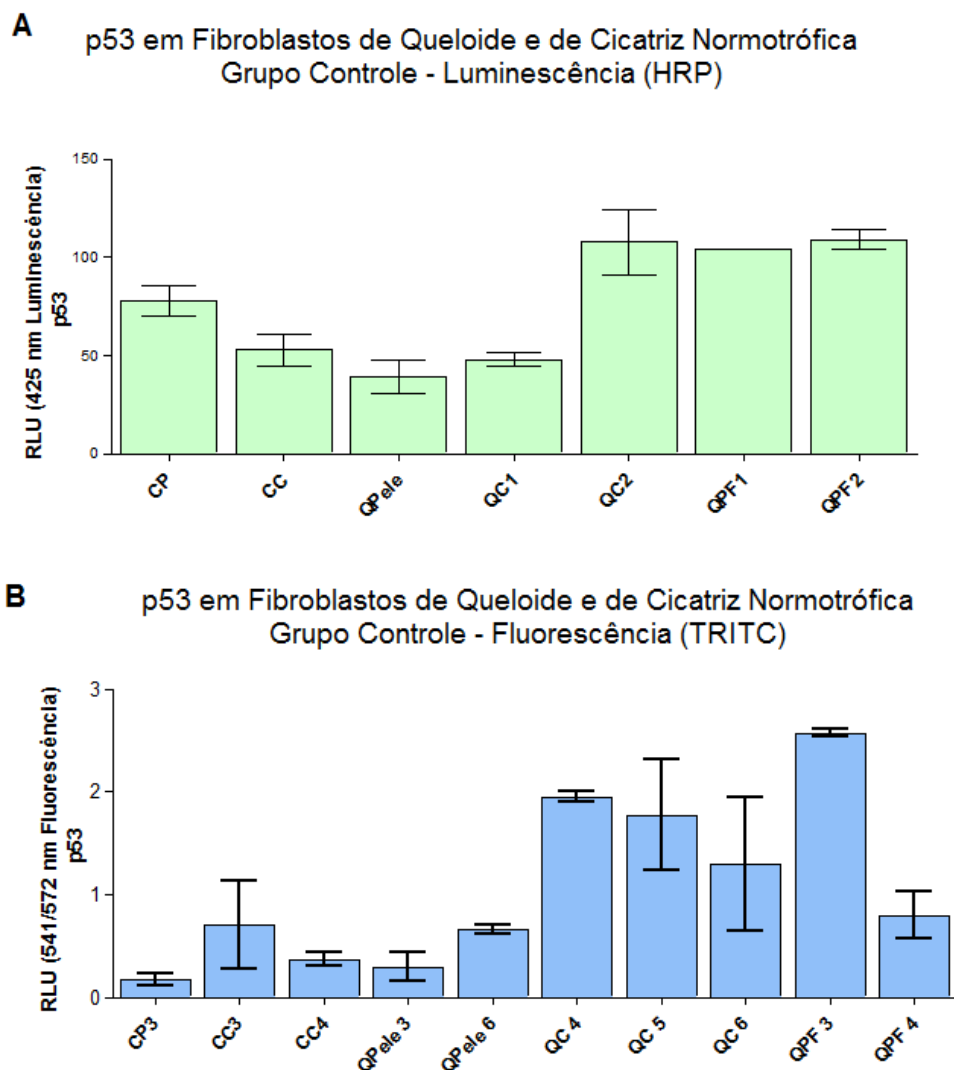


FIGURA 13 – Espectrofotometria. Expressão de p53 em fibroblastos de queleide e cicatriz normotrófica nos subgrupos

controle. (A) Espectrofotometria de luminescência com HRP. (B) Espectrofotometria de fluorescência com TRITC. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento por gráfico (nível de significância: $p < 0,05$ - sem marcação nos gráficos). Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. RLU: Unidades Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (nível de significância: $p < 0,05$).

A figura 13 mostra o resultado obtido ao investigar a expressão de p53 em fibroblastos de queiloide e cicatriz normotrófica no grupo controle (sem adição de neuropeptídeos) para os diversos subgrupos celulares, analisada por espectrofotometria em 2 experimentos equivalentes, luminescência com HRP (figura 13A) e fluorescência com TRITC (figura 13B).

A figura 13A corresponde ao mesmo experimento mostrado na figura 12 acima, em uma análise apenas do grupo controle. Essa análise entre subgrupos nos permite afirmar (com exceção de QC1) que os fibroblastos da região periférica (QPF1, QPF2) e central (QC2) do queiloide apresentaram, em seu estado não tratado (controle), uma expressão de p53 significativamente mais elevada do que os fibroblastos do subgrupo pele adjacente (QPele) do queiloide ($p < 0,01$) e do subgrupo cicatriz normotrófica (CC) ($p < 0,05$ vs QC2 e QPF2; $p < 0,01$ vs QPF1) e aparentemente maior (embora estatisticamente não significante) do que os fibroblastos de pele normal. Por outro lado, os fibroblastos controle dos subgrupos CC e QPele apresentaram uma expressão de p53 significativamente inferior em relação aos fibroblastos controle do subgrupo pele normal (CP).

A análise entre subgrupos da figura 13B permite afirmar que:

- os fibroblastos de queloide do subgrupo QPF3 apresentaram expressão de p53 significativamente maior do que os fibroblastos dos subgrupos CP3, QPele3, e CC4 ($p < 0,01$) e dos subgrupos CC3, QPele6 e QPF4 ($p < 0,05$);

- os fibroblastos de queloide do subgrupo QC4 apresentaram expressão de p53 significativamente mais elevada do que os fibroblastos dos subgrupos CP3 e QPele3 ($p < 0,05$).

Expressão de Caspase-3 em Fibroblastos de Queloide e de Cicatriz Normotrófica Sob a Ação dos Neuropeptídeos CGRP e SP
Fluorescência - TRITC

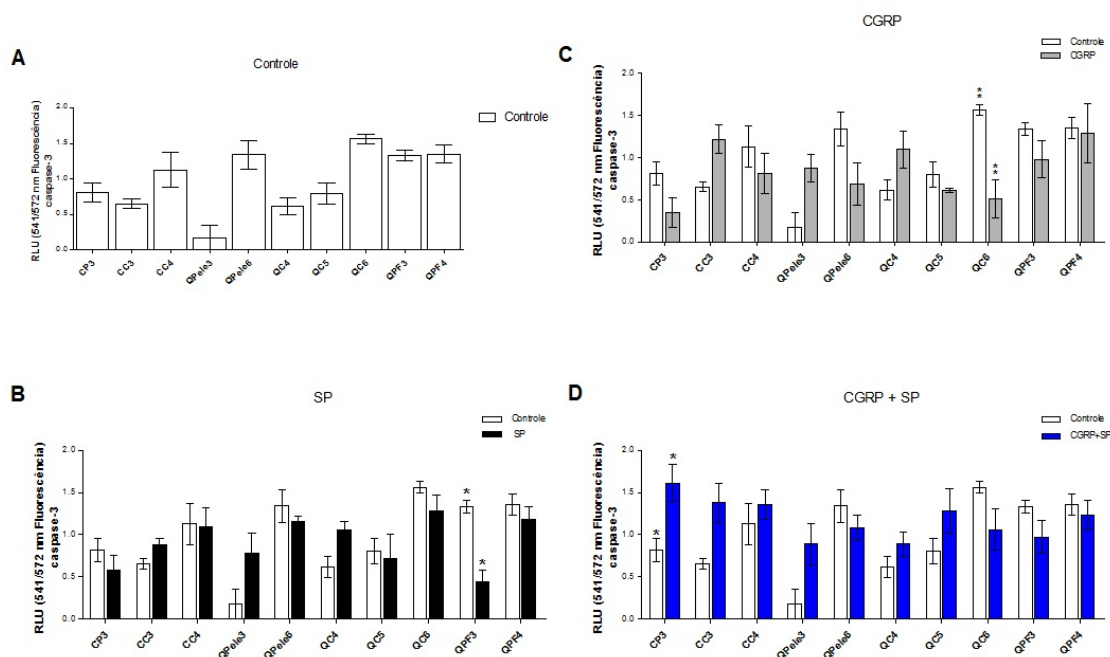


FIGURA 14 – Espectrofotometria de fluorescência com TRITC. Expressão de caspase-3 em fibroblastos de queloide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos. (A) Controle. (B) Controle x CGRP. (C) Controle x SP. (D) Controle x CGRP+SP. Os valores acima representam a média \pm erro padrão dos dados em triplicata de um único experimento. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles dentro de um mesmo subgrupo celular. Os números ao lado dos subgrupos celulares indicam pacientes diferentes, dos quais foram obtidos os fibroblastos. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. RLU: Unidades

Relativas de Luz. Dados analisados utilizando-se 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância: $p < 0,05$).

A figura 14 mostra o resultado obtido ao investigar a expressão de caspase-3 em fibroblastos de queleide e cicatriz normotrófica sob a ação dos neuropeptídeos por espectrofotometria por fluorescência com TRITC.

Os fibroblastos do subgrupo QC6 apresentaram expressão de caspase-3 significativamente diminuída no grupo CGRP em relação ao grupo controle ($p < 0,01$).

Os fibroblastos do subgrupo QPF3 apresentaram expressão de caspase-3 significativamente diminuída no grupo SP em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Os fibroblastos do subgrupo CP3 apresentaram expressão de caspase-3 significativamente aumentada no grupo CGRP+SP em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Nos demais subgrupos não houve diferenças significantes na expressão de caspase-3 sob ação dos neuropeptídeos.

5.6. Microscopia de Fluorescência Confocal

5.6.1. Citoquímica e Imunocitoquímica por Microscopia de Fluorescência Confocal

A análise morfológica de fibroblastos cultivados, provenientes das três diferentes regiões do queleide (pele adjacente, região periférica e região central do queleide) mostrou morfologia preservada, sem a presença

de *blebbings* (extrusões na superfície da célula, características da apoptose), com distribuição homogênea do citoesqueleto (figura 15).

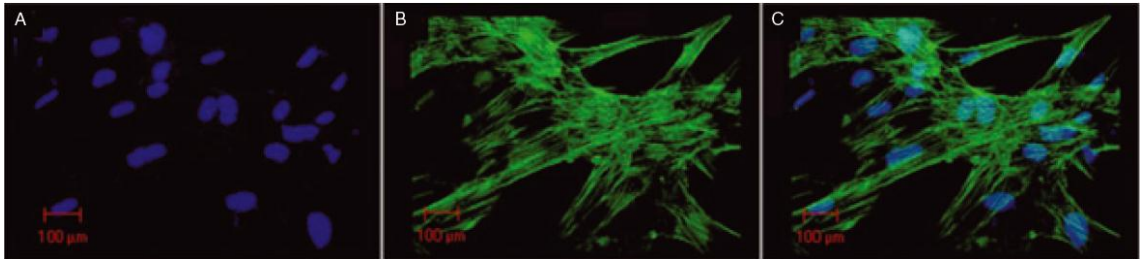


FIGURA 15 – Microscopia confocal. Fibroblastos cultivados da pele adjacente de queiloide. (A) Núcleos celulares marcados com DAPI (azul); (B) Filamentos de actina marcados com faloidina / AlexaFluor-488 (verde); (C) Imagens sobrepostas.

Pode-se observar a distribuição dos filamentos de actina e mitocôndrias na região perinuclear, As imagens sobrepostas mostram a colocalização das organelas e mitocôndrias em torno do núcleo (figura 16). A distribuição das organelas e do citoesqueleto apresentou morfologia normal, sem a presença dos aspectos clássicos da apoptose (figuras 15 e 16).

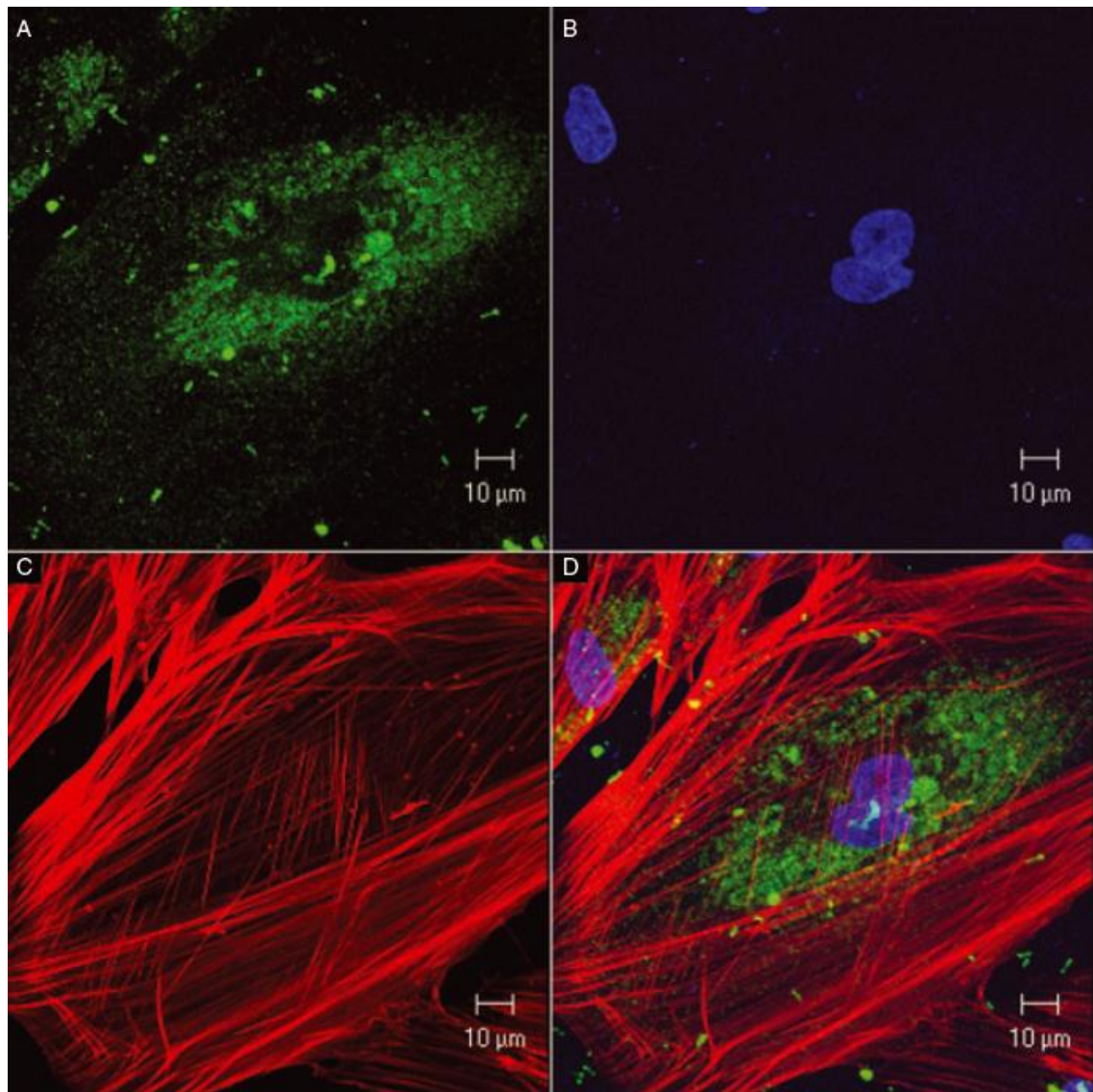


FIGURA 16 – Microscopia confocal. Fibroblastos cultivados da pele adjacente de queuloide. (A) Mitocôndrias marcadas com Mitotracker (verde); (B) Núcleos celulares marcados com DAPI (azul); (C) Filamentos de actina marcados com faloidina / AlexaFluor-594 (vermelho); (D) Imagens sobrepostas.

6. DISCUSSÃO

A fase de inflamação neurogênica da cicatrização da pele passou a ser mais descrita a partir da década de 1990 (LOTTI, HAUTMANN, PANCONESI, 1995). Pelo intenso efeito vasodilatador arteriolar desencadeado pela inflamação neurogênica, ela modula diretamente a quantidade de mediadores inflamatórios como histamina, ácido araquidônico, bradicinina e prostaglandinas, típicas da fase inflamatória tecidual que ocorrerá a seguir, e o recrutamento global das células imuno-inflamatórias que, em conjunto, ativam a fase inflamatória tecidual (BALUK, 1997; HOLZER, 1998; ROSSI & JOHANSSON, 1998; SAUERSTEIN *et al.*, 2000; ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI, 2006). Assim, como consequência direta, a fase de inflamação neurogênica promove o aporte de citocinas e fatores de crescimento, visando em conjunto, a síntese da matriz extracelular pelos fibroblastos na fase seguinte da cicatrização. Por isso, a fase de inflamação neurogênica possui efeito modulador direto nas fases seguintes do processo cicatricial, principalmente na fase proliferativa (AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU, 2008; HOCHMAN *et al.*, 2008).

Os neuropeptídeos, notadamente o CGRP e SP, possuem uma participação específica e ativa no processo de fibrose, diretamente, na fase proliferativa para a produção da matriz extracelular (BALUK, 1997; HOLZER, 1998; ROSSI & JOHANSSON, 1998). Os fibroblastos dérmicos possuem receptores para esses neuropeptídeos, mas seu papel nessas células não é tão conhecido como ocorre na fase da inflamação neurogênica. A expressão de receptores de CGRP, assim como de

adrenomedulina foi demonstrada em queratinócitos e fibroblastos dérmicos humanos, mas ainda falta uma análise mais profunda da ação diferenciada dos neuropeptídeos nessas células (ALBERTIN *et al.*, 2003). O SP induz a síntese de DNA em fibroblastos e sua proliferação, e o fato dessas células expressarem receptores sugere que são capazes de responder a SP e a outros neuropeptídeos durante a resposta inflamatória (NILSSON, VON EULER, DALSGAARD, 1985; HU *et al.*, 2002).

O CGRP é um potente vasodilatador e mitógeno para células endoteliais (LUNDBERG, 1996), além de pró-inflamatório, podendo paradoxalmente atuar de forma anti-inflamatória sobre a resposta imune celular (KALIL-GASPAR, 2003). Em resposta a radiação ultravioleta intestinal, em ratos, houve superexpressão dos neuropeptídeos CGRP e Substância P (SP). Enquanto o SP exacerbou a inflamação intestinal aumentando a produção de superóxido pelos neutrófilos, o extravasamento de proteínas do plasma e causando o aumento da produção de TNF-alfa, pelos mastócitos, o CGRP agiu de maneira oposta, protegendo o intestino e acelerando sua recuperação. O CGRP inibiu as ações promotoras de edema de diversos mediadores inflamatórios, como histamina, leucotrieno B₄ e serotonina, suprimiu a produção de TNF-alfa e contrabalanceou a produção de superóxido, induzida por SP, pelos neutrófilos e macrófagos. CGRP atenuou o infiltrado celular inflamatório, o espessamento da serosa, o espessamento da parede intestinal e o acúmulo de colágeno III. Os mecanismos por meio dos quais o SP exacerba e o CGRP melhora a toxicidade à radiação intestinal ainda não foram elucidados. Considerando a colocalização desses neuropeptídeos nas fibras nervosas, esses estudos suportam a noção de que o equilíbrio local de neuropeptídeos inflamatórios e anti-inflamatórios é fundamental para a homeostase do tecido, como no caso do trato gastrointestinal (WANG *et al.*, 2006).

O SP tem uma distribuição similar ao CGRP no que concerne seus alvos. Vasodilatador extremamente potente, libera óxido nítrico das células endoteliais. Seu efeito é 100 vezes mais potente do que o da histamina nas mesmas concentrações. O SP produz eritema e edema de forma dose-dependente, mas, ao contrário do CGRP, induz extravasamento de plasma (CAPPUGI, TSAMPAU, LOTTI, 1992; LOTTI, HAUTMANN, PANCONESI, 1995; ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI, 2006).

O SP está frequentemente presente numa mesma fibra nervosa com o CGRP, e a liberação de SP pode provocar a coliberação de CGRP que, por sua vez, pode potencializar a ação de SP, embora os efeitos do CGRP devam ser mais duradouros. Além disso, a liberação de SP ou de CGRP pode, ainda, provocar o aumento nos níveis dos receptores de SP (NK-1R) (WALLENGREN, 1997; SCHOLZEN *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2007).

Os neuropeptídeos podem também modular o metabolismo celular nos tecidos cicatriciais, atuando como neuromediadores da fase neurogênica cicatricial, sendo secretados após o rompimento das fibras nervosas quando de uma lesão (ESTEVES JUNIOR, FERREIRA, LIEBANO, 2004; SALO *et al.*, 2007). Esse fato é corroborado pela presença de um retardo no processo de cicatrização em áreas cutâneas denervadas (SMITH & LIU, 2002; BARKER, ROSSON, DELLON, 2006).

As terminações cutâneas nociceptivas são necessárias para a cicatrização de feridas. Uma vez que os neuropeptídeos têm efeito proliferativo sobre queratinócitos e fibroblastos, é razoável presumir que uma disfunção na regulação desses neurotransmissores possa perturbar o processo cicatricial. Assim, distúrbios dérmicos hiperproliferativos como o quelóide, e desordens mesenquimais como o escleroderma poderiam estar relacionados nesse contexto (STELNICKI *et al.*, 2000; ALBERTIN *et al.*, 2003). O esclarecimento da ação neuropeptidérgica nos fibroblastos

dérmicos poderia proporcionar subsídios importantes para uma melhor compreensão do complexo processo de cicatrização.

O fibroblasto é a principal célula secretora de matriz extracelular. Ainda não está esclarecido o mecanismo biomolecular deflagrador da síntese excessiva de fibras colágenas por essas células em cicatrizes fibroproliferativas. Alguns autores consideram que a suscetibilidade em desenvolver uma cicatriz fibroproliferativa poderia advir apenas de fatores predisponentes, e não de uma herança genética determinante propriamente dita, embora ainda não se tenha detectado, tampouco, um fator epigenético determinante (RUSSELL, RUSSELL, TRUPIN, 1982; CANARY *et al.*, 1990). Na literatura existe uma controvérsia quanto à existência de diferenças genóticas entre os fibroblastos de cicatriz fibroproliferativa e de cicatriz normotrófica ou derme normal.

A cultura celular convencional fornece uma visão reducionista das células em arranjo bidimensional, em contraste com seu ambiente multicelular normal e tridimensional. Esse aspecto pode ser mais vantajoso já que fornece parâmetros experimentais definidos para investigar as consequências fenotípicas de alterações genéticas. Em contraste com organismos inteiros, cada linhagem celular constitui uma população, fenotípica- e genotipicamente uniforme, de células individuais derivadas de um único tecido (GRIMM, 2004). Por outro lado, ao se cultivar células *in vitro*, diversas variáveis podem afetar o fenótipo celular, como por contaminação, grau de confluência, presença de adesão célula-célula e densidade de semeadura, dentre outros exemplos (DUBERTRET & COULOMB, 1994).

No caso do queiloide, uma neoplasia cicatricial fibroproliferativa benigna cuja fisiopatogenia permanece desconhecida (BERMAN & BIELEY, 1996; HOCHMAN *et al.*, 2008), que apresenta potencial de

crescimento autônomo e desenvolvimento *in vitro* mesmo na ausência de fatores humorais (PLACIK & LEWIS, 1992; HOCHMAN *et al.*, 2004b; HOCHMAN *et al.*, 2005), torna-se fundamental a utilização de modelos de estudo *in vitro* para se compreender os mecanismos de formação (LEE *et al.*, 2004). Sua importância é corroborada pelo fato do queiloide ocorrer exclusivamente em humanos (O'SULLIVAN, O'SHAUGHNESSY, O'CONNOR, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999), o que tem dificultado pesquisas em modelos animais (RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA, 2008; OGAWA & CHIN, 2008).

Estudos *in vitro* realizados com fibroblastos de queiloide com frequência apresentam resultados contraditórios (LADIN *et al.*, 1998; TEOFOLI *et al.*, 1999; CHODON *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2007a; LU *et al.*, 2007b). Isso pode ocorrer devido ao fato do queiloide apresentar características distintas, genótípicas (TEOFOLI *et al.*, 1999; LU, GAO, LI, 2000) e fenotípicas (LU *et al.*, 2007b; LIU *et al.*, 2008), em diferentes regiões da lesão propriamente dita, e ainda pelo fato de se apresentar ou não em atividade clínica (crescimento, hiperemia, prurido e/ou dor) quando da coleta das amostras (LEE *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2007b).

Em níveis moleculares e bioquímicos foram demonstradas diferenças existentes nas vias de sinalização celular de fibroblastos de cicatriz fibroproliferativa e de cicatriz normotrófica. Essas diferenças estão relacionadas principalmente às proteínas que controlam o desenvolvimento do ciclo celular e à morte celular programada (apoptose). Muitos pesquisadores têm investigado a expressão gênica e a ação da proteína p53 neste contexto (LADIN *et al.*, 1998; AKASAKA *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2004; SATISH *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2007b).

6.1. Citometria de Fluxo

Isolamento e Cultivo de Fibroblastos de Queloides com Base nas Diferenças Biológicas das suas Regiões Específicas

A importância de se especificar qual parte da lesão queloidiana será estudada, bem como seu status clínico (queloides ativo x quiescente) tem sido fortemente enfatizada uma vez que já foram relatadas várias diferenças biológicas entre fibroblastos derivados de diferentes regiões do queloides (ANGEL & KARIN, 1991; DESMOULIERE *et al.*, 1995; APPLETON, BROWN, WILLOUGHBY, 1996; LADIN *et al.*, 1998; TEOFOLI *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 2001; GIUGLIANO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008; TUAN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008). Nossa análise da distribuição do ciclo celular indicou que 60% dos fibroblastos da região periférica do queloides encontravam-se nas fases proliferativas do ciclo celular, enquanto a maior parte dos fibroblastos da região central e da pele adjacente ao queloides estava distribuída nas fases G₀-G₁ (~58%) (figura 12B). Além disso, fibroblastos da pele adjacente ao queloides apresentaram um índice apoptótico mais elevado quando comparados com fibroblastos tanto da região central quanto periférica do queloides. Esse desequilíbrio entre proliferação e apoptose pode ser responsável pela patogênese do queloides. Nossos dados corroboram aqueles obtidos por LU *et al.* (2007b), que compararam a distribuição do ciclo celular de fibroblastos das regiões central e periférica do queloides.

A adição de CGRP aos fibroblastos do Grupo Queloides provocou um aumento significativo no índice apoptótico dos fibroblastos da região periférica do queloides (subgrupo QPF), o mesmo ocorrendo quando da

adição de CGRP+SP, mas não alterou o índice apoptótico de QPele ou QC (figura 10B).

A cultura primária de células utilizando técnicas de explante, quando comparada a técnicas de dissociação enzimática (utilizando dispase e/ou colagenase), proporciona um rendimento inicial mais baixo em termos de quantidade de células. No entanto, as técnicas de explante permitem uma melhor preservação das características celulares, evitando um trauma celular significativo, causado pelo ataque enzimático, que pode aplicar uma pressão seletiva em culturas de longo prazo, uma vez que já foi comprovado que a dispersão enzimática provoca um grave estresse em células de vertebrados (DIETEL *et al.*, 1987; RUBIN, 1997). Diversos procedimentos mecânicos e químicos já foram comparados em relação à otimização do rendimento celular e minimização do dano ao DNA pelos métodos propriamente ditos. Quando comparada ao isolamento pela colagenase, a dissociação mecânica de células causou menos dano ao DNA (KOSMEHL *et al.*, 2006). Entretanto, dadas as características estruturais do queloide (como sua rigidez), os métodos mecânicos de dissociação celular não são aplicáveis à cultura primária de células de queloide. A tripsinização, utilizada para a subcultura (passagem), resultou em baixo dano ao DNA, similar ao obtido por dissociação mecânica (KOSMEHL *et al.*, 2006).

Devido às características potencialmente prejudiciais da dissociação enzimática, vários pesquisadores preferem ser cautelosos, escolhendo métodos mais conservadores, tal como o método de coleta e cultura aqui descrito, padronizado em nosso Laboratório de Cultura de Células Ecto- e Mesodérmica da Cirurgia Plástica da Unifesp (TUCCI-VIEGAS *et al.*, 2010). Com base em nossos resultados, apresentamos um modelo simples, confiável e reprodutível, que ainda tem a vantagem de poder ser adaptado

pelo pesquisador às suas condições específicas. O modelo padronizado por nós se mostrou eficiente para o isolamento e cultivo *in vitro* de fibroblastos provenientes das diferentes regiões do queloide. Sua simplicidade e facilidade de execução pode torná-lo uma importante ferramenta para o estudo e compreensão das características específicas dos fibroblastos derivados das diferentes regiões do queloide, quando em cultura.

6.2. Determinação da Atividade Celular por MTT

6.2.1. Atividade Celular/Viabilidade por MTT Sob Ação dos Neuropeptídeos

Não houve alteração significativa na atividade celular devido à adição de neuropeptídeos, nos subgrupos celulares do Grupo Queloide ou do Grupo Cicatriz em relação aos respectivos controles, nem ao longo do tempo (em intervalos entre 4 e 24 horas da aplicação dos neuropeptídeos), nem após 24 ou 40 horas da aplicação dos neuropeptídeos. Ou seja, CGRP, SP e CGRP+SP não afetaram a atividade dos fibroblastos dérmicos em nenhum dos subgrupos estudados, ao longo do tempo. HU *et al.* (2000) observaram efeitos positivos do SP na proliferação de fibroblastos dérmicos após 48 horas, também por MTT. Entretanto, a concentração de SP utilizada por esses autores foi de 25 ng/ml ou superior, enquanto a utilizada por nós foi 10^{-7} M, a mais comum encontrada na literatura (KAHLER *et al.*, 1996; PARENTI *et al.*, 1996; KISS *et al.*, 1999; YULE & WHITE, 1999), que corresponde a cerca de 0,13 ng/ml, 200 vezes menos concentrada. KAHLER, HEROLD, WIEDERMANN (1993) e KAHLER *et al.* (1996), utilizando a concentração 10^{-7} M de SP em culturas de fibroblastos dérmicos, afirmaram que SP foi capaz de estimular a

proliferação de fibroblastos em presença de ácido acetilsalicílico. Embora o meio de cultura utilizado também apresentasse algumas diferenças em relação ao nosso, segundo os autores, o ácido acetilsalicílico foi o diferencial, ao ser utilizado em conjunto com SP no estímulo da proliferação de fibroblastos. KISS *et al.* (1999), estudando os efeitos de CGRP e SP no sistema IL-8/IL8-receptor (IL-8RA), em culturas de fibroblastos e queratinócitos dérmicos humanos, observaram que em concentrações de 10^{-8} M, SP e CGRP não tiveram nenhum efeito sobre os fibroblastos, mas regularam positivamente a expressão de mRNA de IL-8RA em queratinócitos. YULE & WHITE (1999) observaram a migração de fibroblastos de pulmão humano de linhagem (IMR-90) e de fibroblastos 3T3 quando expostos a concentrações de 10^{-14} a 10^{-7} M de CGRP ou de bombesina por períodos entre 2 a 24 horas. Os autores demonstraram que tanto CGRP quanto bombesina eram quimiotáticos para fibroblastos 3T3 e IMR-90 em cultura. Interessante notar, entretanto, que WITHERS *et al.* (1996) já haviam demonstrado que fibroblastos 3T3 não apresentam receptores para CGRP.

Em vista do exposto acima, podemos supor que uma concentração cerca de 200 vezes mais alta de neuropeptídeos, citada apenas em um dos trabalhos (HU *et al.*, 2000) ou a adição de algum outro fator ao meio de cultura (como o ácido acetilsalicílico), poderia resultar em efeito positivo dos neuropeptídeos sobre a atividade de fibroblastos dérmicos humanos em nossos experimentos. Entretanto, nossos resultados obtidos referentes ao índice apoptótico dos fibroblastos do subgrupo QPF sob ação de CGRP ou CGRP+SP (figura 10B), ou aqueles referentes à expressão de p53 quando da adição de neuropeptídeos ao meio de cultura (figura 18) nos

confirmaram que a dosagem de neuropeptídeos era, de fato, uma dosagem funcional.

6.2.2. Atividade Celular por MTT de Fibroblastos de Queloide e Cicatriz Normotrófica ao Longo do Tempo

6.2.2.1. Grupo Queloide

Observamos um padrão de atividade celular ao longo do tempo, segundo o subgrupo celular considerado. Esse padrão mostrou-se consistente, e os dados foram estatisticamente significantes.

Analisando-se os resultados da figura 14, sobre a atividade celular por MTT ao longo do tempo, células dos subgrupos QPele e QPF, podemos perceber que o subgrupo QPele tem uma atividade bem mais estável ao longo do tempo, com oscilações pequenas de atividade entre um ponto e outro do gráfico. Observando-se os dois gráficos QPF (QPF1 e QPF2), percebemos que ambos apresentam um padrão de atividade extremamente parecido, mesmo tratando-se de células provenientes de pacientes diferentes, e esse padrão de atividade ao longo do tempo é muito mais irregular do que o observado para QPele. A sobreposição dos gráficos na figura 14E permite avaliar a similaridade das curvas QPF e o contraste com a estabilidade da curva QPele. A figura 17 mostra, em outro experimento similar, os mesmos subgrupos, e pode-se observar mais uma vez a estabilidade da curva QPele ao longo do tempo, e a irregularidade das curvas QPF. Também ali é possível observar que as curvas QPF apresentam homologias entre si, embora as células sejam provenientes de pacientes diferentes.

Observando-se as variações entre QPele e QC (figura 16), percebemos que as curvas QC (QC1 e QC2) apresentam uma maior irregularidade em relação a QPele, embora menos exacerbada do que aquela apresentada pelas curvas QPF. Aqui também observamos pela sobreposição das curvas QC, a grande homologia entre elas, embora as células sejam provenientes de pacientes diferentes.

Analisando-se todos esses gráficos, assim como os da figura 13, embora com alguns pontos a menos na curva, percebemos claramente que as curvas QPF e QC em cada experimento correspondem a uma exacerbação em maior (QPF) ou menor (QC) grau da curva QPele. Podemos perceber que os fibroblastos da região periférica e central do queuloide apresentam uma grande oscilação de sua atividade ao longo do tempo, mas essa atividade é proporcional à atividade de QPele. Quaisquer que sejam os fatores, internos ou externos, como condições do meio, pH, nível de CO₂, temperatura, etc., que possam ter variado entre um experimento e outro, e que influenciaram a atividade celular dos fibroblastos, afetaram muito mais (positiva- ou negativamente) os fibroblastos da região periférica, em seguida da região central do queuloide, e pouco afetaram a atividade dos fibroblastos da pele adjacente do queuloide.

Com esse experimento, comprovamos mais uma vez quão diferentes biologicamente e metabolicamente são entre si os fibroblastos provenientes das diferentes regiões do queuloide, e a importância, tanto de se especificar a porção queuloideana estudada, quanto de isolar e cultivar criteriosamente os fibroblastos provenientes de cada uma das regiões do queuloide. Não encontramos na literatura esclarecimentos a esse respeito, nem trabalhos similares com fibroblastos de queuloide.

6.2.2.2. Grupo Cicatriz Normotrófica

Os resultados apresentados pelas células do Grupo Cicatriz (figura 15) foram, no mínimo, surpreendentes. Esperávamos encontrar um padrão para CP (figura 15A) semelhante ao encontrado para QPele, mais homogêneo e tendendo à linearidade. Até mesmo os fibroblastos 3T3 (embrionários de camundongo) utilizados como um padrão a mais de comparação, apresentaram um perfil mais linear (figura 14D), embora mais irregular do que o perfil de QPele. O perfil encontrado para CC (figura 15B), comparativamente, está muito mais “homogêneo”, mais próximo à linearidade.

Esse experimento, por ter sido realizado apenas uma vez, precisaria ser repetido pelo menos duas vezes para ter valor como resultado. Analisando-o como está, podemos sugerir que talvez as marcações das células CP e CC tenham sido inadvertidamente invertidas. Os resultados passariam a fazer maior sentido. Só teremos certeza de tal inversão após repetido o experimento.

6.3. Análise Quantitativa de Células em Apoptose por

Espectrofotometria

6.3.1. Expressão de p53

De um modo geral, nossos resultados mostraram uma maior expressão de p53 em fibroblastos das regiões central e periférica do queiloide (subgrupos QC e QPF) em relação aos fibroblastos da pele adjacente (subgrupos QPele) e aos fibroblastos do Grupo Cicatriz (subgrupos CP, CC). Esses resultados estão de acordo com os de LADIN *et*

al. (1998), que demonstraram uma maior expressão de p53 em fibroblastos de quelóide, e uma maior concentração nas áreas periféricas do quelóide, e com os de TANAKA *et al.* (2004), que verificaram uma maior expressão de p53 em quelóide em comparação a cicatrizes hipertróficas vermelhas, cicatrizes hipertróficas brancas e duras, e cicatrizes atróficas brancas.

Na grande maioria dos subgrupos celulares, a adição de neuropeptídeos em qualquer combinação provocou uma diminuição na expressão de p53, sendo que nos subgrupos de fibroblastos de quelóide (QC e QPF), essa diminuição foi estatisticamente significativa em relação ao controle. Ou seja, a expressão de p53 é normalmente mais elevada nos fibroblastos das regiões central e periférica (QC e QPF) do quelóide, e a adição de neuropeptídeos ao meio de cultura diminuiu a expressão de p53 de modo significativo exatamente nesses mesmos subgrupos celulares. CHEN, WANG, ZHUANG (2006) estudaram os efeitos de SP sobre a proliferação e apoptose em fibroblastos dérmicos e de cicatrizes patológicas (quelóides e cicatrizes hipertróficas), e seus resultados demonstraram que sob ação de SP, os índices apoptóticos dos fibroblastos de quelóide diminuíram significativamente, sendo bem menores do que os de cicatriz hipertrófica e de derme normal. Considerando que SP diminuiu a expressão de p53 em fibroblastos de quelóide, é possível que SP diminua os índices apoptóticos em fibroblastos de quelóide pela modulação da expressão de p53.

6.3.2. Expressão de Caspase-3

Nossos resultados referentes à expressão de caspase-3 sob ação dos neuropeptídeos foram conflitantes: um subgrupo QC (QC6) apresentou diferenças significantes sob ação do CGRP, ao passo que o outro subgrupo (QC5) do mesmo experimento não apresentou diferenças. Um subgrupo

QPF (QPF3) apresentou diferenças significantes de expressão de caspase-3 sob ação do SP, enquanto o outro subgrupo (QPF4) do mesmo experimento não apresentou diferenças. Ambas as diferenças, quando ocorreram, foram de diminuição da expressão da caspase-3 em presença do neuropeptídeo. Entretanto, por serem resultados isolados, e seus pares terem apresentado resultados muito diferentes, preferimos ser cautelosos e desconsiderar todo o conjunto até repetição de toda a bateria de testes. Nossos resultados foram, então, inconclusivos quanto à expressão de caspase-3.

6.4. Considerações Finais

O presente estudo abre uma perspectiva no sentido de se continuar estudando as influências dos neuropeptídeos CGRP e SP sobre os fibroblastos de queloide. Nesse sentido, tendo em vista a metodologia já padronizada, vale a pena investigar mais a fundo os mecanismos de apoptose, repetindo os experimentos com caspase-3, a fim de se complementar os resultados obtidos nos experimentos com p53.

A produção de colágeno I e III é maior em fibroblastos da região periférica do queloide, em relação à região central e à pele adjacente (SYED *et al.*, 2011), o que faz todo o sentido considerando-se a patologia do queloide. Considerando-se as interações entre SP e TGFb1, mostrando a expressão de maior quantidade de mRNA para TGFb1 após exposição ao SP (HU *et al.*, 2002) e o já conhecido papel do TGFb na síntese de colágeno, inclusive por fibroblastos de queloide (LEE *et al.*, 1999), é de suma importância investigar a influência dos neuropeptídeos CGRP e SP na produção de colágeno I e II em fibroblastos de queloide.

Outros ensaios de proliferação celular com fibroblastos de quelóide e neuropeptídeos também devem ser feitos, analisando-se os efeitos dos neuropeptídeos após um período maior de tempo, avaliando-se o número de células e a viabilidade celular.

Essas informações nos ajudarão a elucidar a ação neuropeptidérgica em fibroblastos dérmicos, especificamente em fibroblastos de quelóide.

7. CONCLUSÕES

1. O modelo de explante padronizado, baseado nas diferenças biológicas das regiões específicas do quelóide, se mostrou eficiente para o isolamento e cultivo *in vitro* de fibroblastos provenientes dessas regiões do quelóide.
2. A atividade dos fibroblastos dérmicos medida ao longo do tempo (em um período de 4 a 24 horas) variou, sendo diferente entre os subgrupos celulares, mas similar dentro de um mesmo subgrupo, comprovando as diferenças biológicas entre as regiões do quelóide.
3. CGRP promoveu uma diminuição do índice apoptótico no subgrupo QC e um aumento no subgrupo QPF comparados ao subgrupo controle enquanto CGRP + SP promoveram um aumento no subgrupo QPF comparados ao subgrupo controle.
4. Fibroblastos de quelóide (subgrupos QC e QPF) apresentaram maior expressão de p53 do que fibroblastos da pele adjacente do quelóide (QPele) ou do Grupo Cicatriz (subgrupos CP e CC).
5. CGRP, SP e CGRP+SP provocaram uma diminuição na expressão de p53 em fibroblastos de quelóide dos subgrupos QC e QPF.

REFERÊNCIAS

Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, Fujita K, Masuda T, Asuwa N, Inuzuka K, Kiguchi H, Ishii T. Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts *in vitro*. *Lab Invest*. 2000;80(3):345-57.

Akasaka Y, Fujita K, Ishikawa Y, Asuwa N, Inuzuka K, Ishihara M, Ito M, Masuda T, Akishima Y, Zhang L, Ito K, Ishii T. Detection of apoptosis in keloids and a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma. *Wound Repair Regen*. 2001;9(6):501-6.

Akasaka Y, Ito K, Fujita K, Komiyama K, Ono I, Ishikawa Y, Akishima Y, Sato H, Ishii T. Activated caspase expression and apoptosis increase in keloids: cytochrome c release and caspase-9 activation during the apoptosis of keloid fibroblast lines. *Wound Repair Regen*. 2005;13(4):373-82.

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):32-8.

Albertin G, Carraro G, Parnigotto PP, Conconi MT, Ziolkowska A, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Human skin keratinocytes and fibroblasts express adrenomedullin and its receptors, and adrenomedullin enhances their growth *in vitro* by stimulating proliferation and inhibiting apoptosis. *Int J Mol Med*. 2003;11(5):635-9.

Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns*. 2001;27(7):717-22.

Amann S, Reinke C, Valet G, Moser U, Leuenberger H. Flow-cytometric investigation of cellular metabolism during oxidative stress and the effect of tocopherol. *Int J Vitam Nutr Res*. 1999;69(5): 356-61.

Angel P, Karin M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta*. 1991;1072:129–57.

Appleton I, Brown J B, Willoughby D A. Apoptosis, necrosis, and proliferation. Possible implications in the etiology of keloids. *Am J Pathol* 1996;149:1441–7.

Baldwin H. Keloid management. In: Robinson JK, Hanke CW, Sengelmann RD, Siegel DM, editors. *Surgery of the skin*. Mosby; 2005. p.705–18.

Baluk P. Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1997;2(1):76-81.

Barker AR, Rosson GD, Dellon AL. Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg*. 2006;57(3):339-42.

Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, Katayama I. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(4):316-21.

Berman B, Bielek HC. Adjunct therapies to surgical management of keloids. *Dermatol Surg.* 1996;22(2):126-30.

Bkaily G, Gros-Louis N, Naik R, Jaalouk D, Pothier P. Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol Cell Biochem.* 1996;154: 113-21.

Booth BA, Polak KL, Uitto J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. *Biochem Biophys Acta.* 1980;607(7):145-60.

Bourdon JC, Laurenzi VD, Melino G, Lane D. p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death Differ.* 2003;10(4):397-9.

Bulut K, Felderbauer P, Deters S, Hoeck K, Schmidt-Choudhury A, Schmidt WE, Hoffmann P. Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(5):535-41.

Campaner AB, Ferreira LM, Gragnani A, Bruder JM, Cusick JL, Morgan JR. Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol.* 2006;126(5):1168-76.

Canary PCV, Fillippo R, Pinto LHP, Aidar S. Papel da radioterapia no tratamento de queloides: análise retrospectiva de 267 casos. *Rev Bras Cir.* 1990;80(5):291-5.

Cappugi P, Tsampau D, Lotti T. Substance P provokes cutaneous erythema and edema through a histamine-independent pathway. *Int J Dermatol.* 1992;31(3):206-9.

Ceccarini C, Eagle H. pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc Nat Acad Sci.* 1971;68:229-33.

Chen J, Wang JH, Zhuang HX. Influence of substance P on the proliferation and apoptosis of fibroblasts of pathological scars. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2006;22(4):277-80.

Chin GS, Liu W, Steinbrech D, Hsu M, Levinson H, Longaker MT. Cellular signaling by tyrosine phosphorylation in keloid and normal human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(7):1532-40.

Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, Funayama E, Furukawa H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1661-9

Craig RD, Schofield JD, Jackson DS. Collagen biosynthesis in normal and hypertrophic scars and keloid as a function of the duration of the scar. *Br J Surg.* 1975;62(9):741-4.

Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol.* 1994;130(4):444-52.

Datubo-Brown DD. Keloids: a review of the literature. *Br J Plast Surg.* 1990;43(1):70-7.

Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146:56-66.

- Dietel M, Arps H, Gerding D, Trapp M, Niendorf A. Establishment of primary cell cultures: experiences with 155 cell strains. *Klin Wochenschr.* 1987;65:507-12.
- Dubertret L, Coulomb B. Reconstruction of human skin in culture. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1994;188(3):235-44.
- Esteves Junior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004;19(6):626-9.
- Felderbauer P, Bulut K, Hoeck K, Deters S, Schmidt WE, Hoffmann P. Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(12):1475-80.
- Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Ciênc.* 2009; 81(3):623-9.
- Giugliano G, Pasquali D, Notaro A, Brongo S, Nicoletti G, D'Andrea F, Bellastella A, Sinisi AA. Verapamil inhibits interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production in primary cultures of keloid fibroblasts. *Br J Plast Surg.* 2003;56:804-0.
- Grimm S. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. *Nat Rev Genet.* 2004;5(3):179-89.
- Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O, Nilsson J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3299-303.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119(2):203-10.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas F C, Mariano M. Experimental model in hamster (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras*. 2004a;19(supl.1):69-78.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch as an experimental model to investigate human skin and keloid heterologous graft. *Acta Cir Bras*. 2004b;19(supl.1):79-88.

Hochman B, Ferreira LM. Queloides. In: Ferreira LM. *Guias de Medicina Ambulatorial Hospitalar - Universidade Federal de São Paulo: Guia de Cirurgia Plástica*. São Paulo, Brasil: Ed. Manole; 2007. p.65-74.

Hochman B, Ishizuka CK, Itamoto KY, Ferreira LM. Cicatriz Hipertrófica. In: Ferreira LM. *Guias de Medicina Ambulatorial Hospitalar - Universidade Federal de São Paulo: Guia de Cirurgia Plástica*. São Paulo, Brasil: Ed. Manole; 2007. p.55-64.

Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, Ferreira LM. Nerve Fibers: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):651-652.

Hochman B, Vilas Bôas FC, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch. *Acta Cir Bras*. 2005;20(3):200-12.

Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol.* 1998;30(1):5-11.

Hordinsky MK, Ericson ME. Relationship between follicular nerve supply and alopecia. *Dermatol Clin.* 1996;14(4):651-60.

Hu D, Chen B, Zhu X, Tao K, Tang C, Wang J. Substance P up-regulates the TGF-beta 1 mRNA expression of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2002;18:234-6.

Johansson O, Fantini F, Hu H. Neuronal structural proteins, transmitters, transmitter enzymes and neuropeptides in human Meissner's corpuscles: a reappraisal using immunohistochemistry. *Arch Dermatol Res.* 1999;291(7-8):419-24.

Kahler CM, Herold M, Reinisch N, Wiedermann CJ. Interaction of substance P with epidermal growth factor and fibroblast growth factor in cyclooxygenase-dependent proliferation of human skin fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1996;166(3):601-8.

Kahler CM, Herold M, Wiedermann CJ. Substance P: a competence factor for human fibroblast proliferation that induces the release of growth-regulatory arachidonic acid metabolites. *J Cell Physiol.* 1993;156(3):579-87.

Kahler CM, Sitte BA, Reinisch N, Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur J Pharmacol.* 1993;249:281-6.

Kalil-Gaspar P. Neuropeptídeos na pele / Neuropeptides in the skin. *An Bras Dermatol.* 2003;78(4):483-98.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Barbosa J. Experimental model for collagen estimation in cell culture. *Acta Cir Bras.* 2004a;19 Suppl 1:17-22.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Campaner AB, Durão Jr MS. Experimental model for establishment of hypoxia in 75 cm² culture flasks. *Acta Cir Bras.* 2004b;19 Suppl 1:23-7.

Kiss M, Kemeny L, Gyulai R, Michel G, Husz S, Kovacs R, Dobozy A, Ruzicka T. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone on the IL-8/IL-8 receptor system in a cultured human keratinocyte cell line and dermal fibroblasts. *Inflammation.* 1999;23(6):557-67.

Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem.* 2006;25:2097-106.

Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. P53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Rep Reg.* 1998;6(1):28-37.

Lee SS, Yosipovitch G, Chan YH, Goh CL. Pruritus, pain, and small nerve fiber function in keloids: a controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:1002-6.

Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg.* 1999;43(2):179-84.

Liu JY, Hu JH, Zhu QG, Li FQ, Sun HJ. Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2006;155(4):657-62.

Liu Y, Gao J, Liu X, Lu F, Liu H. Correlation analysis between clinical phenotypes of keloids and polymorphism of p53 gene codon 72. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2008;22:1433-6.

Lotti T, Hautmann G, Panconesi E. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:482-96.

Lu F, Gao J, Li X. The distribution of cell cycle on fibroblasts derived from the pathological scars and analysis of Fas gene mutations in keloids using polymerase chain Reaction-based single-strand conformation polymorphism. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2000;80(9):709-12.

Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H, Ou C. Fas-mediated apoptotic signal transduction in keloid and hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg.* 2007a;119(6):1714-21.

Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H, Ou C. Biological differences between fibroblasts derived from peripheral and central areas of keloid tissues. *Plast Reconstr Surg.* 2007b;120(3):625-30.

Lundberg, JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 1996;48(1):113-78.

Luo S, Benathan M, Raffoul W, Panizzon RG, Egloff DV. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):87-96.

McGrouther DA. Hypertrophic or keloid scars? *Eye.* 1994;8(Pt 2):200-3.

Messadi DV, Le A, Berg S, Jewett A, Wen Z, Kelly P, Bertolami CN. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):511-7.

Muir IFK. On the nature of keloid and hypertrophic scars. *Br J Plast Surg.* 1990;43(1):61-9.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139(2): 271-9.

Niessen FB, Spauwen PHM, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(5):1435-58.

Nigra TP, Martin GR, Eagle H. The effect of environmental pH on collagen synthesis by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973;53(1):272-81.

Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature.* 1985;315(6014):61-3.

Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, Richmond A. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2000;8(5):371-82.

- Ogawa R, Chin MS. Animal models of keloids and hypertrophic scars. *J Burn Care Res.* 2008;29(6):1016-7.
- Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, Ansel JC, Bunnett NW. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. *J Invest Dermatol.* 1999;112(6):873-81.
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differ.* 2003;10(4):431-42.
- O'Sullivan ST, O'Shaughnessy M, O'Connor TP. Aetiology and management of hypertrophic scars and keloids. *Ann R Coll Surg Engl.* 1996;78(3 Pt 1):168-75.
- Parenti A, Amerini S, Ledda F, Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;353(5):475-81.
- Parkhouse N, Crowe R, McGrouther DA, Burnstock G. Painful hypertrophic scarring and neuropeptides. *Lancet.* 1992;340(8832):1410.
- Placik OJ, Lewis VL. Immunologic associations of keloids. *Surg Gynecol Obstet.* 1992;175(2):185-93.
- Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 2003;30(1):77-89.
- Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res.* 2008;29(2):363-8.

Reis ALN. Principais características das cicatrizes queloidianas. *An Bras Dermatol.* 1994;69(6):495-7.

Rossi R, Johansson O. Cutaneous innervation and the role of neuronal peptides in cutaneous inflammation: a minireview. *Eur J Dermatol.* 1998;8(5):299-306.

Rubin H. Cell aging *in vivo* and *in vitro*. *Mech Ageing Dev.* 1997;98:1-35.

Russell JD, Russell SB, Trupin KM. Fibroblast heterogeneity in glucocorticoid regulation of collagen metabolism: genetic or epigenetic? *In vitro.* 1982;18(6):557-64.

Russell JD, Witt WS. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57(2):207-12.

Salo P, Bray R, Seerattan R, Reno C, McDougall J, Hart DA. Neuropeptides regulate expression of matrix molecule, growth factor and inflammatory mediator mRNA in explants of normal and healing medial collateral ligament. *Regul Pept.* 2007;142(1-2):1-6.

Satish L, Lyons-Weiler J, Hebda PA, Wells A. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2006;14(4):463-70.

Sauerstein K, Klede M, Hilliges M, Schmelz M. Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin. *J Physiol.* 2000;529 Pt 3:803-10.

Sayah DN, Soo C, Shaw WW, Watson J, Messadi D, Longaker MT, Zhang X, Ting K. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res.* 1999;87(2):209-16.

Schierle HP, Scholz D, Lemperle G. Elevated levels of testosterone receptors in keloid tissue: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):390-4.

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol.* 1998;7(2-3):81-96.

Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002;307(3):281-91.

Stelnicki EJ, Doolabh V, Lee S, Levis C, Baumann FG, Longaker MT, Mackinnon S. Nerve dependency in scarless fetal wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(1):140-7.

Syed F, Ahmadi E, Iqbal SA, Singh S, McGrouther DA, Bayat A. Fibroblasts from the growing margin of keloid scars produce higher levels of collagen I and III compared with intralesional and extralesional sites: clinical implications for lesional site-directed therapy. *Br J Dermatol.* 2011;164(1):83-96.

Tanaka A, Hatoko M, Tada H, Iioka H, Niitsuma K, Miyagawa S. Expression of p53 family in scars. *J Dermatol Sci.* 2004;34(1):17-24.

Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, Campanella A, De Pita' O, Puddu P. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. *J Dermatol Sci.* 1999;22:31-7.

Tuan TL, Hwu P, Ho W, Yiu P, Chang R, Wysocki A, Benya PD. Adenoviral overexpression and small interfering RNA suppression

demonstrate that plasminogen activator inhibitor-1 produces elevated collagen accumulation in normal and keloid fibroblasts. *Am J Pathol.* 2008;173:1311-25.

Tucci-Viegas VM, Hochman B, França JP, Ferreira LM. Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions. *Int Wound J.* 2010;7(5):339-48.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature Rev.* 2007;8:275-283.

Wallengren J. Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1997;2(1):49-55.

Wang J, Qiu X, Kulkarni A, Hauer-Jensen M. Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4112-8.

Withers DJ, Coppock HA, Seufferlein T, Smith DM, Bloom SR, Rozengurt E. Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 1996;378(1):83-7.

Wu H, Guan C, Qin X, Xiang Y, Qi M, Luo Z, Zhang C. Upregulation of substance P receptor expression by calcitonin gene-related peptide, a possible cooperative action of two neuropeptides involved in airway inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(5):513-24.

Xu B, Liu ZZ, Zhu GY, Yang JF, Zhao JP, Wang JC, Cai JL. Efficacy of recombinant adenovirus-mediated double suicide gene therapy in human keloid fibroblasts. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33:322-8.

Yule KA, White SR. Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. *Exp Lung Res.* 1999;25(3):261-73.

Zancanaro C, Merigo F, Crescimanno C, Orlandini S, Osculati A. Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. *J Anat.* 1999;194:433-44.

Zegarska B, Lelińska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 2006;58(1):13-21.

Zhang LQ, Laato M. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol.* 2001;90 Suppl 215:29-32.

NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole Ltda.; 2001.248p.
- Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses – Guia Prático. São Paulo. Ed. LMP; 2008. 84p.
- Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> –terminologia em saúde.

ABSTRACT

Introduction: Given that nociceptive neurogenic stimulation is considered the primary trigger of the healing process in the skin, that CGRP and SP increase fibroblast proliferation *in vitro*, and given the lack of studies correlating CGRP, SP p53 and apoptosis in keloid, it becomes important to investigate whether skin neuropeptides can influence the expression of p53 and apoptosis in keloid. A possible association between neuropeptides and p53 gene could represent a new path to a better physiopathogenic understanding of pathological fibroproliferative scars and, therefore, the advent of more specific treatments. **Objective:** To investigate the expression of p53 gene and the apoptotic index in keloid fibroblast cultures exposed to the action of the neuropeptides CGRP and SP. **Methods:** Keloid fibroblasts were grown in culture medium with or without the addition of CGRP and SP. The apoptotic index and cell cycle were determined by flow cytometry and the labeling of apoptosis key proteins was done by spectrophotometry. Cell activity was evaluated over time by MTT. Cell morphology was analyzed by confocal microscopy. **Results:** An explant model for keloid fibroblast isolation and culture based on the biological differences of its specific regions was standardized. Cellular activity in keloid fibroblasts varied over time and was different among the fibroblasts subgroups but similar within the same subgroup, however was not affected by the addition of CGRP, SP or SP + CGRP. Keloid fibroblasts derived from peripheral and central regions had higher p53 expression than fibroblasts derived from the skin adjacent to the keloid scar, fibroblasts derived from normotrophic scar or from normal skin adjacent to the normotrophic scar. CGRP, SP and SP + CGRP caused a decrease in p53 expression in keloid fibroblasts of peripheral and central regions compared to all other subgroups studied. **Conclusion:** CGRP, SP and SP + CGRP caused a decrease in p53 expression in keloid fibroblasts.

APÊNDICES

Apêndice 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de maio de 2008.
CEP 0264/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) VANINA MONIQUE TUCCI VIEGAS
Co-investigadores: Bernardo Sergio Hochman Rzeszetkowski; Maroos Henrique Santoni, Lydia Masako Ferreira (Orientadora)
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "CGRP na expressão de p53 e apoptose em culturas de fibroblastos de quelóide".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO OBSERVACIONAL - COM TECIDOS HUMANOS.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve.

OBJETIVOS: Investigar a expressão do gene p53 e o índice apoptótico em culturas de células de fibroblastos de quelóide, cicatrizes normotróficas e de pele, à ação do neuropeptídeo CGRP..

RESUMO: As amostras das células serão obtidas de 10 pacientes portadores de quelóides e de 10 pacientes portadores de cicatrização normal. Os fragmentos de pele serão obtidos em procedimentos cirúrgicos de pacientes do ambulatório Casa da Cirurgia Plástica da UNIFESP..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo bem fundamentado, desenvolvido de acordo com as normas adotadas para pesquisa clínica..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

TCLE: Apresentou o TCLE para utilização de amostras de pele que serão utilizadas em cultura de células. Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: SEM FINANCIAMENTO EXTERNO.

CRONOGRAMA: 36 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 25/5/2009 e 25/5/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

006408

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto: “CGRP na expressão de p53 e apoptose em culturas de fibroblastos de queiloide”

1. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo científico, que visa compreender melhor a influência de determinada substância (neuropeptídeo) liberada pelos nervos da pele (terminações nervosas), nas células obtidas do queiloide que já foi removido, para compreender melhor como se forma o queiloide.
2. Após ser realizada a cirurgia eletiva de retirada do queiloide ou da cicatriz, a porção retirada é normalmente desprezada. Entretanto, em vez de jogar fora, neste estudo esse material será enviado para o Laboratório de Cultura de Células da Pele da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), para a realização do estudo acima mencionado com as células existentes no queiloide, chamadas fibroblastos. O Laboratório de Cultura de Células está localizado à Rua Pedro de Toledo, 943 - Vila Clementino, São Paulo. Telefone (11) 5579-2583.
3. Nenhum transtorno ou prejuízo será causado a você, pois como já foi explicado, o tecido do queiloide seria descartado; portanto, nenhum procedimento a mais será acrescentado à sua cirurgia. Não haverá, também, benefício direto a você.
4. Não existem procedimentos alternativos, pois não serão realizados outros procedimentos além daqueles necessários ao procedimento eletivo.
5. Você terá acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Bernardo Hochman, que poderá ser encontrado na sede da Disciplina de Cirurgia Plástica situada no 4º andar do Hospital São Paulo, à Rua Napoleão de Barros, 715 - 4º andar. Telefone (11) 5571-6579. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar - cj 14, (11) 5571-1062. E-mail: cepunifesp@epm.br.
6. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

7. É garantida a liberdade de retirada deste consentimento a qualquer momento. É garantido o seu direito de estar sempre atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, ou de conhecimentos do pesquisador.
8. Os pacientes provenientes do **Ambulatório de Especialidades do Hospital São Paulo** não terão despesas pessoais, incluindo a consulta. Também não há compensação financeira relacionada à participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
9. É compromisso do pesquisador utilizar os dados coletados para esta pesquisa.
10. Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido é restrito somente à análise dos dados obtidos pela utilização do material obtido (queloide retirado).

Apêndice 3

FICHA DE AVALIAÇÃO DA PACIENTE

FICHA DE AVALIAÇÃO

CGRP na expressão de p53 e apoptose em culturas de fibroblastos de queuloide

Data: ____/____/____

Nome: _____ Sexo: () F () M

Nome da Mãe: _____ RH (Hosp. SP): _____

RG: _____ Data Nasc: ____/____/____ Est. Civil: _____ Filhos: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____

Profissão: _____ Telefone: _____

Grupo: () Cicatriz () Queuloide Obs.: _____

LOCALIZAÇÃO DA LESÃO (SOMENTE UMA):

CAUSA DA CICATRIZ:

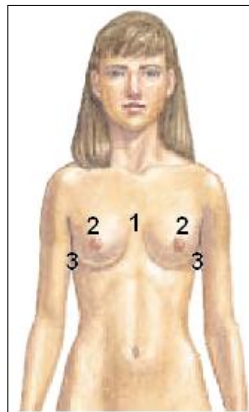
() Intervenção Cirúrgica:

() Ferimento Acidental

() Queimadura:

() Acne

() Outros: _____



- | |
|--|
| <p>1. Região esternal
2. Região peitoral
3. Região lateral torácica anterior</p> |
|--|

INFECÇÃO:

() SIM () NÃO

TEMPO DE EVOLUÇÃO DA CICATRIZ: _____

Tipo de pele (Classificação de Fitzpatrick): _____

Altura: _____ Peso: _____ IMC: _____ PA: _____ FC: _____

Possui alguma doença? () SIM () NÃO Alergia? () SIM () NÃO

Qual? _____ Qual? _____

Faz uso contínuo de remédio? () SIM () NÃO

Quais? _____

Atividade física? () Sedentário () Regularmente - Qual: _____

Boa cicatrização? () SIM () NÃO

Grupo Queloides: () Prurido
() Dor
() Outros: _____

Apêndice 4

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CGRP E SP PARA A CULTURA DE FIBROBLASTOS

A concentração de CGRP utilizada foi padronizada em experimentos-piloto. Nesses experimentos, foi adicionado ao meio de cultura do grupo experimental o neuropeptídeo CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina) nas concentrações 10^{-7} M e 10^{-9} M, 24h após o início da cultura (confluência de 40-50%). O tempo de exposição das células ao neuropeptídeo CGRP foi de 24 h. Assim, 24h após o início da cultura, o meio foi trocado por meio + CGRP nas concentrações citadas acima, permanecendo por 24h. As garrafas dos grupos controle (sem adição de CGRP) também tiveram o meio trocado.

Em seguida, o meio foi retirado e as células foram tripsinizadas, contadas e submetidas a Citometria de Fluxo para determinação da viabilidade celular e taxas de apoptose e necrose utilizando-se anexina V e iodeto de propídeo.

Nos testes-piloto, as células do grupo experimental (com CGRP) se comportaram de maneira similar nas duas concentrações testadas. A concentração 10^{-7} M para CGRP, foi então escolhida para ser utilizada nos experimentos.

Testes semelhantes foram efetuados com o neuropeptídeo Substância P. O mesmo resultado foi obtido, e a concentração 10^{-7} M para SP também foi a escolhida.

Essas concentrações estão de acordo com dados da literatura (KAHLER *et al.*, 1996; PARENTI *et al.*, 1996; KISS *et al.*, 1999; YULE & WHITE, 1999).

Apêndice 5 – Artigo Publicado

Tucci-Viegas VM, Hochman B, França JP, Ferreira LM. Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions. *Int Wound J.* 2010;7(5):339-48.

Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions.

Abstract

In vitro studies with keloid fibroblasts frequently present contradictory results. This may occur because keloids present distinct genotypic and phenotypic characteristics in its different regions, such as the peripheral region in relation to the central region. We suggest an explant model for keloid fibroblasts harvesting, standardizing the initial processing of keloid samples to obtain fragments from different regions, considering its biological differences, for primary cell culture. The different keloid regions were delimited and fragments were obtained using a 3-mm diameter punch. To remove fragments from the periphery, the punch was placed in one longitudinal line extremity, respecting the lesion borders. For the central region, it was placed in the intersection of lines at the level of the largest longitudinal and transversal axes, the other fragments being removed centrifugally in relation to the first one. Primary fibroblast culture was carried out by explant. Flow cytometry analysis showed cell cycle differences between the groups, confirming its different origins and biological characteristics. In conclusion, our proposed model proved itself efficient for keloid fibroblast isolation from specific regions and cultivation. Its simplicity and ease of execution may turn it into an important tool for studying the characteristics of the different keloid-derived fibroblasts in culture.

an increased production of both interleukin-6 and vascular endothelial growth factor (26).

Lu *et al.* showed that cultured fibroblasts derived from both central and peripheral parts of keloids displayed significant resistance to Fas-mediated apoptosis. Also, their analysis of cell cycle distribution indicated that the majority of fibroblasts derived from peripheral parts of keloids were in proliferative periods of the cell cycle (G₂-S phase), whereas the majority of fibroblasts derived from keloid centres were in G₀-G₁ phase. Fas and Bcl-2 expression did not differ significantly between the groups, but p53 expression was much higher in fibroblasts derived from central parts. These findings suggested that differences in cell cycle distribution and p53 protein expression may account for the different growth characteristics of keloid peripheries and centres (22).

Taken together, these studies illustrate the importance of specifying which part of the keloid is being used, so as to evaluate its clinical status. Some discrepancies found in cell culture studies involving keloid-derived fibroblasts (27–32) may be explained by this lack of information concerning the origin and clinical status of the keloid cells used.

Thus, to reduce biases in studies involving keloid fibroblast culture, it is imperative to standardise the collection of these fibroblasts, and researchers should report the details of the collection method used, the region of the keloid from which cultured fibroblasts were derived and also if keloids were in clinical activity at the moment of collection. The present study suggests an explant model for keloid fibroblasts culture, with the standardisation of the initial process of keloid samples to obtain fragments from different regions, taking into consideration its biological differences, in order to perform primary culture of keloid fibroblasts.

METHODS

Collection of keloid fragments to obtain fibroblasts

This method applies to planar, non peduncular keloids. Fresh keloids obtained at the time of surgical excision were used following informed consent and with approval from Universidade Federal de São Paulo's Ethical Committee.

Four non Caucasian female patients from the Plastic Surgery Division of the Universidade Federal de São Paulo, aged 18–36 years who had a planar, non peduncular keloid on the trunk of at least 1-year evolution, in clinical activity (presenting one or more of the following characteristics: growth, hyperaemia, pruritus and/or pain), were surgically treated. The exclusion criteria were, briefly: keloids previously treated; patients with chronic dermatopathies, metabolic, collagen or degenerative/auto-immune diseases; malignant neoplasms or patients submitted to systemic or topic treatment with corticosteroids. For our research purposes, the keloids measured at least 3 × 2 cm at the longitudinal and transversal axes, respectively. Keloids were excised in monobloc, in subcutaneous plane by fusiform peri-keloid incision, including a skin fragment in the extremities, which corresponds to the cutaneous exceeding tissue necessary for an adequate suture coaptation (Figure 1).

Keloid fragments used for primary fibroblast culture were obtained from the excised specimens by a circular punch of 3 mm diameter and 10 mm depth (Figure 2). Keloid adjacent skin fragments, used here for comparison purposes (control group), were obtained from the most distant point in relation to the keloid border, maintaining a minimum distance of 5 mm from the border (Figure 2A).

The central keloid region should be marked from the right angle intersection between two lines placed at the level of the largest longitudinal axis and the largest lesion transversal axis. The keloid peripheral region corresponds

Key Points

- to reduce biases in studies involving keloid fibroblasts culture, it is imperative to standardise the collection of these fibroblasts, and researchers should report the details of the collection method used, the region of the keloid from which cultured fibroblasts were derived and also if keloids were in clinical activity at the moment of collection
- the present study suggests an explant model for keloid fibroblasts culture, with the standardization of the initial process of keloid samples to obtain fragments from different regions, taking into consideration its biological differences, in order to perform primary culture of keloid fibroblasts
- four non Caucasian female patients from the Plastic Surgery Division of the Universidade Federal de São Paulo, aged 18–36 years who had a planar, non peduncular keloid on the trunk of at least 1-year evolution, in clinical activity (presenting one or more of the following characteristics: growth, hyperaemia, pruritus and/or pain), were surgically treated
- keloids were excised in monobloc, in subcutaneous plane by fusiform peri-keloid incision, including a skin fragment in the extremities, which corresponds to the cutaneous exceeding tissue necessary for an adequate suture coaptation



Figure 1. Keloid excision in monobloc by fusiform peri-keloid incision including a skin fragment in the extremities.

Apêndice 6 – Artigo Publicado

Bonatti S, Hochman B, Tucci-Viegas VM, Furtado F, Pinfildi CE, Pedro AC, Ferreira LM. *In vitro* effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts. *Acta Cir Bras.* 2011;26(1):25-30.

In vitro effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts

Abstract

PURPOSE:

To quantify keloid fibroblasts after irradiation with 470 nm blue LED, *in vitro*.

METHODS:

Fibroblasts from keloid and adjacent skin have been obtained from 6 patients. Cells have been cultivated and maintained in DMEM culture medium. In Petri dishes, they were irradiated with energy doses of 6J, 12J and 18J. After 24 h, counting was done by the average of the triplicates for each sample.

RESULTS:

There were no significant differences in the number of irradiated keloid fibroblasts at the studied doses ($p=0.261$). In adjacent skin fibroblasts, differences were observed ($p=0.025$) concerning the doses of 18 J and 6 J ($p=0.03$).

CONCLUSIONS:

There was a reduction in the number of adjacent skin fibroblasts irradiated with 470 nm blue LED at the energy dose of 18 J compared to the ones irradiated at the energy dose of 6 J. There were no changes in keloid fibroblasts counting at any of the doses applied, 24 h after irradiation.

6 - ORIGINAL ARTICLE
Wound Healing

In vitro effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts¹

Efeito *in vitro* do LED (Light Emitting Diode) de 470 nm em fibroblastos de quelóide

Silviana Bonatti¹, Bernardo Hochman², Vanina Monique Tucci-Viegas³, Fabianne Furtado³, Carlos Eduardo Pinfildi⁴, Ana Carolina Pedro⁵, Lydia Masako Ferreira⁶

¹ Research performed at the Plastic Surgery Division, Department of Surgery, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Brazil.

² FT, Fellow Improvement Program, Plastic Surgery Division, Department of Surgery, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Acquisition of data, helped with technical procedures, collection and processing of study information, manuscript writing.*

³ Affiliate Professor, Plastic Surgery Division, Department of Surgery, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Mentor, conception and design of the study, manuscript writing and critical revision.*

⁴ Fellow PhD degree, Plastic Surgery Division, Department of Surgery, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Helped with technical procedures, collection and processing of study information.*

⁵ Associate Professor, Plastic Surgery Division, Department of Surgery, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Collection of study information.*

⁶ Graduate student, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Processing of study information, involved with technical procedures.*

⁷ Full Professor, Chairwoman Plastic Surgery Division, Head Department of Surgery, UNIFESP, Sao Paulo-SP, Brazil. *Scientific and intellectual content of the study, acquisition and interpretation of data, critical revision.*

ABSTRACT

Purpose: To quantify keloid fibroblasts after irradiation with 470nm blue LED, *in vitro*. **Methods:** Fibroblasts from keloid and adjacent skin have been obtained from 6 patients. Cells have been cultivated and maintained in DMEM culture medium. In Petri dishes, they were irradiated with energy doses of 6J, 12J and 18J. After 24 h, counting was done by the average of the triplicates for each sample. **Results:** There were no significant differences in the number of irradiated keloid fibroblasts at the studied doses ($p=0.261$). In adjacent skin fibroblasts, differences were observed ($p=0.025$) concerning the doses of 18 J and 6 J ($p=0.03$). **Conclusions:** There was a reduction in the number of adjacent skin fibroblasts irradiated with 470nm blue LED at the energy dose of 18 J compared to the ones irradiated at the energy dose of 6 J. There were no changes in keloid fibroblasts counting at any of the doses applied, 24 h after irradiation.

Key words: Fibroblasts. Keloid. Phototherapy. Lasers. Skin. Laser Therapy, Low-Level.

RESUMO

Objetivo: Quantificar fibroblastos de quelóide após irradiação com LED azul de 470nm, *in vitro*. **Métodos:** Foram obtidos fibroblastos de quelóide e pele adjacente, de seis pacientes. As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura DMEM. Em placas de Petri, receberam irradiação com doses de energia de 6J, 12J e 18J. Após 24 horas a contagem foi feita pela média da triplicata para cada amostra. **Resultados:** Não houve diferença na quantidade de fibroblastos de quelóide irradiados nas doses estudadas ($p=0,261$). Observou-se diferença nos fibroblastos de pele adjacente ($p=0,025$), com relação às doses de 18 J e 6 J ($p=0,03$). **Conclusões:** Houve redução dos fibroblastos de pele adjacente irradiados com LED azul de 470 nm na dose de energia de 18 J em relação à dose de 6 J. Não houve alteração na quantidade de fibroblastos de quelóide nas doses aplicadas após 24 horas da irradiação.

Descritores: Fibroblastos. Quelóide. Fototerapia. Lasers. Pele. Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

Introduction

Keloid is a wound repair disorder resulting from excessive collagen deposition, which occurs in susceptible individuals, and its pathophysiology has not yet been fully elucidated^{1,2}. The literature presents many options of treatment, alone or in combination, nevertheless they are not specific. Among the therapeutic modalities that have been most used, stand out the administration of topical and intralesional

corticosteroids, the use of silicon plates, pressure therapy and exeresis followed by betetherapy^{3,4}.

Recently, high potency LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) and IPL (Intense Pulsed Light) were added to that arsenal. However, these resources of phototherapy have high cost and relative success, besides the fact that the applications are painful and involve risks of burns and hypochromia^{5,7}.

Apêndice 7 – Artigo Submetido a Publicação

Hochman B, Tucci-Viegas VM, Monteiro, PKP, Gaiba, S, Ferreira LM. The action of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P on cultured skin fibroblasts.

The action of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P on cultured skin fibroblasts

Abstract

The most abundant neuropeptide in the skin is calcitonin gene-related peptide (CGRP), followed by substance P (SP). The neuropeptides SP and CGRP are frequently present in the same nerve fiber. Their proinflammatory effects have been mostly described in the neurogenic inflammation in wound healing. The neurogenic inflammation modulates the amount of inflammatory mediators and recruitment of immune-inflammatory cells for the inflammatory phase that will follow. These neuropeptides may also act during the proliferative phase of wound healing by producing extracellular matrix, since dermal fibroblasts have receptors for CGRP and SP, although their role in these cells are not well known. **PURPOSE:** the aim of this study was to review the action of the neuropeptides CGRP and SP on cultured skin fibroblasts. A systematic review was conducted on the Medline and Web of Science databases. Only 9 articles on human skin fibroblasts were retrieved of which 8 were related to SP and only 1 was related to both the CGRP and SP. SP stimulates a concentration-dependent proliferation and chemoattraction of human fibroblasts, induces the autocrine production of SP, modulates the expression of neurokinin A receptors, and is related to immune/allergic skin reactions. CGRP and ADM both bind to the same type of transmembrane receptor, Calcitonin-Receptor-Like Receptor (CRLR), and its specificity is given by subtypes 1, 2 or 3 Receptor-Activity Modifying Proteins (RAMPs). In conclusion, SP is a neuropeptide that has been shown to exert proliferative and chemoattractant effects on human skin fibroblasts, and to be linked to cutaneous immune reactions. CGRP receptor expression is rather weak in human skin fibroblasts. However, other studies should be done in order to find out other possible actions of CGRP in skin fibroblasts and wound healing.

Apêndice 8

MTT – TESTES PRELIMINARES: CURVA DE DENSIDADE

TABELA 01 – Absorbância a 570 nm segundo o número de células semeado, em placa de 96 poços, para curva de densidade por MTT

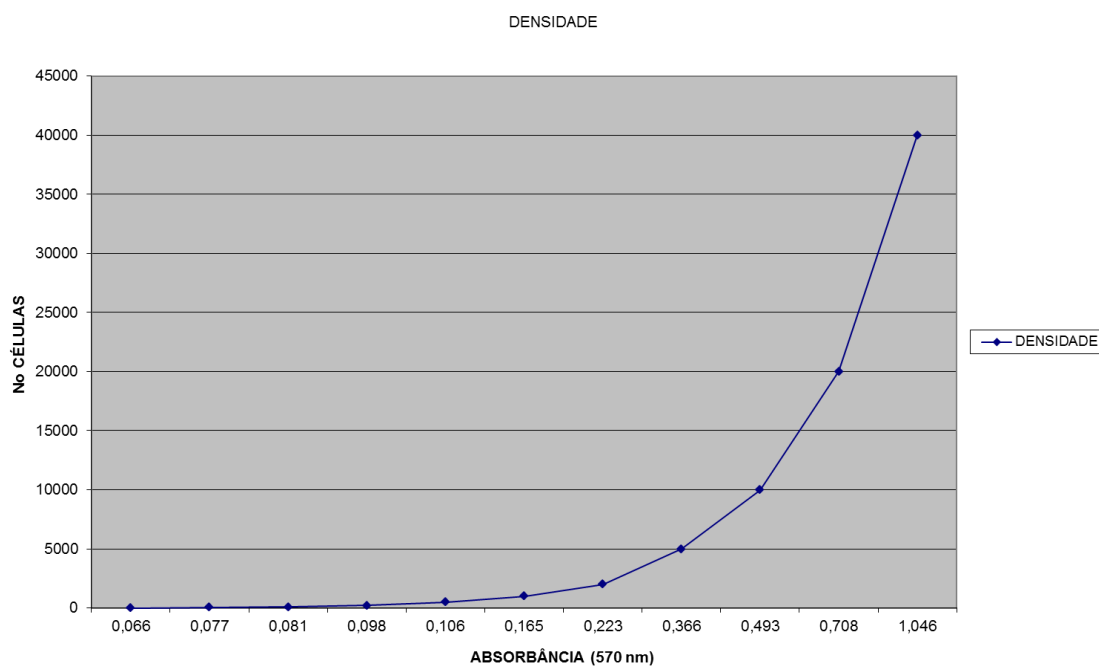
	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12
A	0,071	0,079	0,085	0,100	0,112	0,146	0,210	0,300	0,458	0,708	0,918
B	0,069	0,076	0,082	0,108	0,101	0,201	0,216	0,449	0,546	0,703	1,243
C	0,057	0,077	0,077	0,087	0,104	0,148	0,244	0,350	0,476	0,714	0,978
MÉDIA	0,066	0,077	0,081	0,098	0,106	0,165	0,223	0,366	0,493	0,708	1,046
No. Cél.	0	50	100	200	500	1000	2000	5000	10000	20000	40000
iniciais			1x10e2	2x10e2	5x10e2	1x10e3	2x10e3	5x10e3	1x10e4	2x10e4	4x10e4
											100% confl garantido

* 100% confluência = 1×10^5 células/cm²

Como o poço tem 0,32 cm², 100% no poço = $3,2 \times 10^4$ células

Obs.: células utilizadas: fibroblastos de linhagem 3T3 (embrionários de camundongo).

GRÁFICO 01 – Curva de Densidade por MTT



Apêndice 9

Cultura de fibroblastos – fotomicrografias óticas para controle de morfologia e confluência.

Fibroblastos de linhagem celular 3T3 (*Albino Swiss Mouse Embryo Fibroblast Cells, 3T3 Cell Line* – fibroblastos embrionários de camundongo)

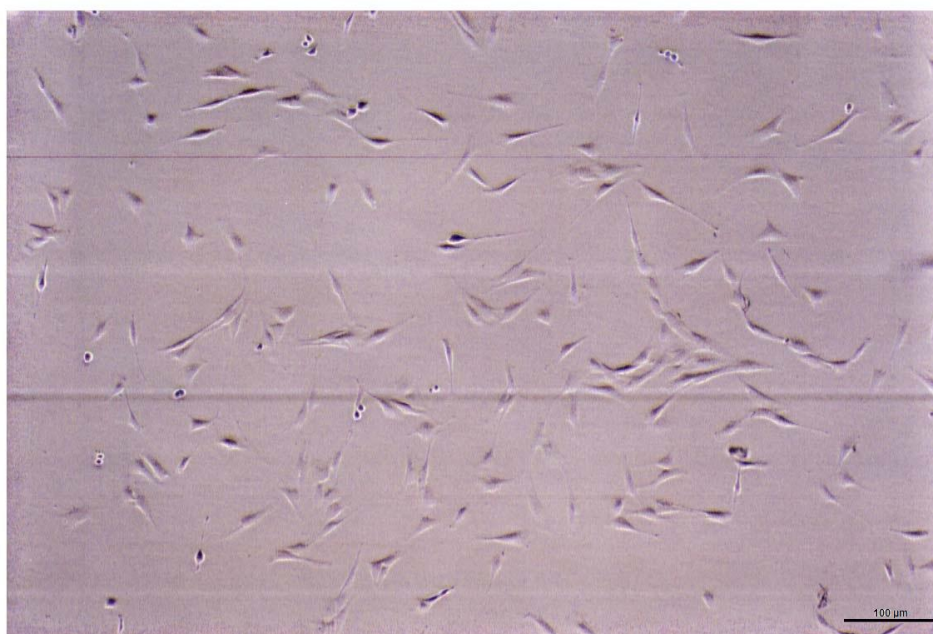


FIGURA 17 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3 mostrando as células aderidas, em baixa confluência, mas com distribuição homogênea na garrafa. Barra: 100 μm. Obj. 4x + 1,5 x. Aumento 60x.

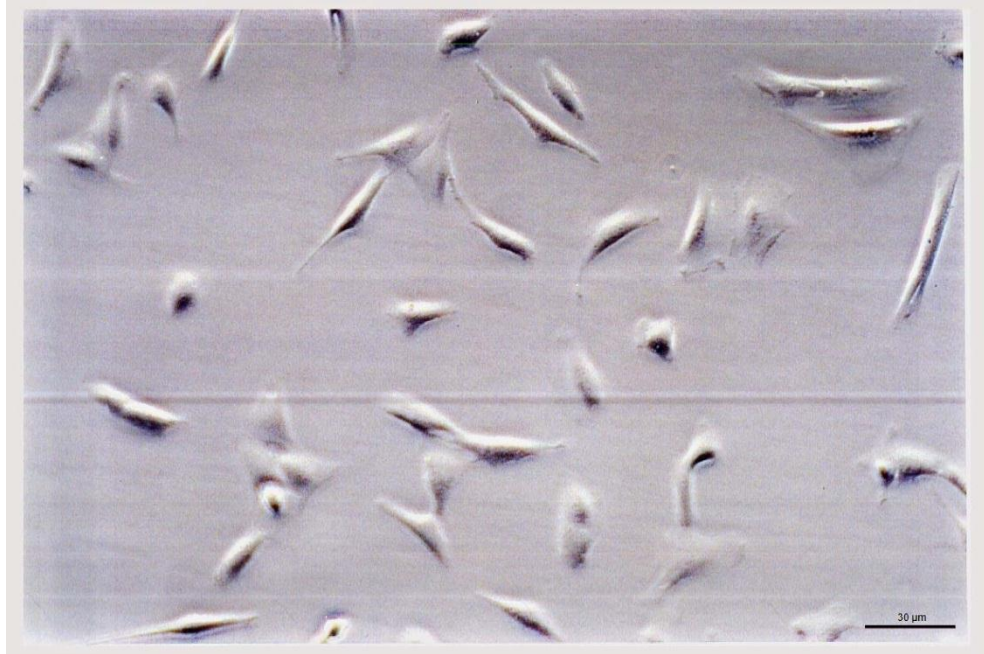


FIGURA 18 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3 mostrando as células aderidas, em baixa confluência, mas com distribuição homogênea na garrafa. Barra: 30 μm. Obj. 10x + 1,5x. Aumento 150x.



FIGURA 19 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3. Células aderidas, em baixa confluência e com morfologia típica. Barra: 20 μm. Obj. 20x + 1,5x. Aumento 300x.

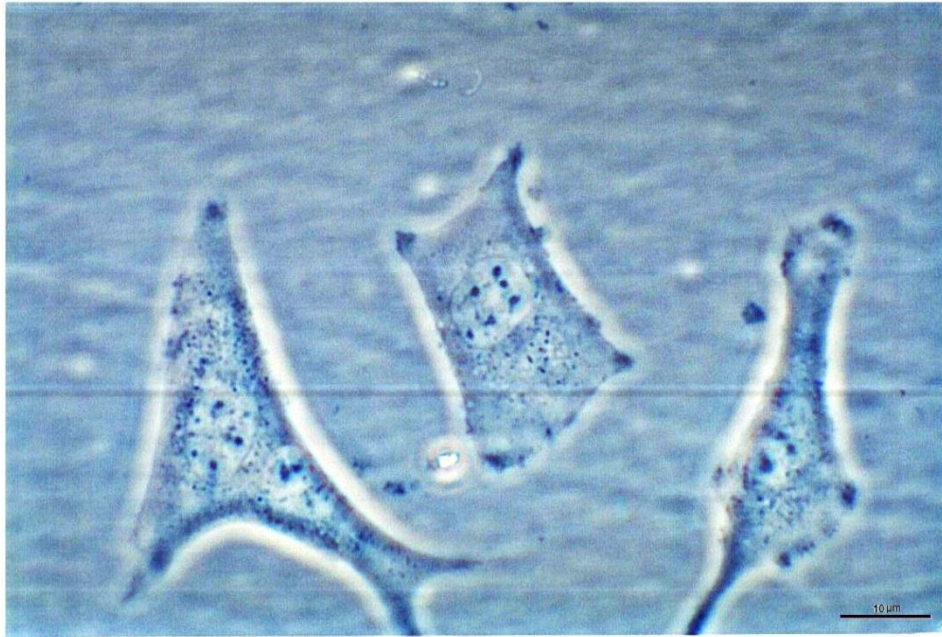


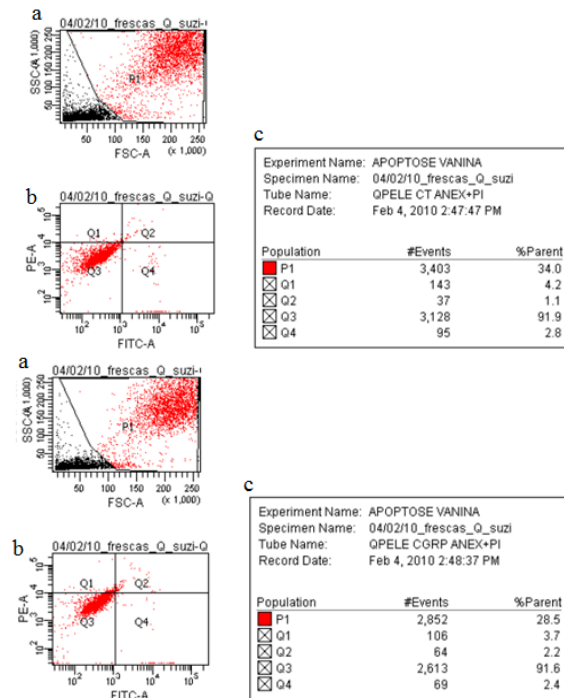
FIGURA 20 – Microscopia ótica de cultura de fibroblastos 3T3. Células aderidas apresentando morfologia típica. Barra: 10 µm. Obj. 40x + 1,5x. Aumento 600x.

Apêndice 10

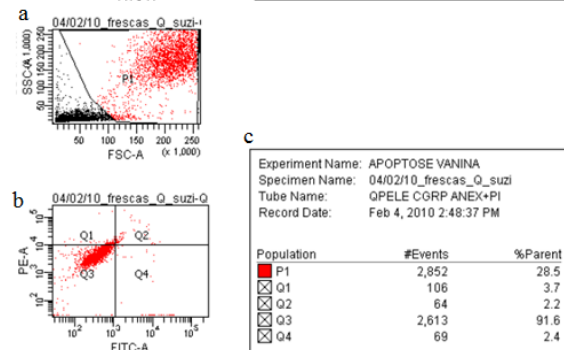
Citometria de Fluxo - Quantificação do Número de Células e Viabilidade Celular pelo Iodeto de Propídeo.

Resultados completos de um experimento de cada grupo, com os gráficos obtidos na citometria.

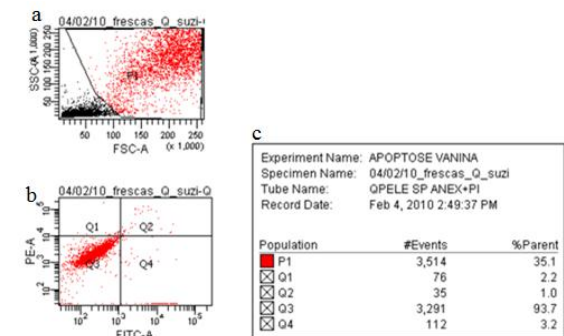
GRUPO QUELOIDE – QPELE
A - QPELE CONTROLE



B - QPELE CGRP



C - QPELE SP



D - QPELE CGRP + SP

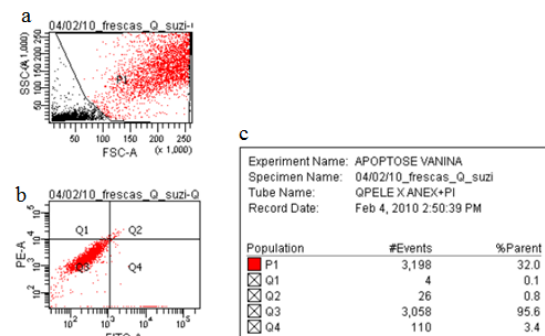
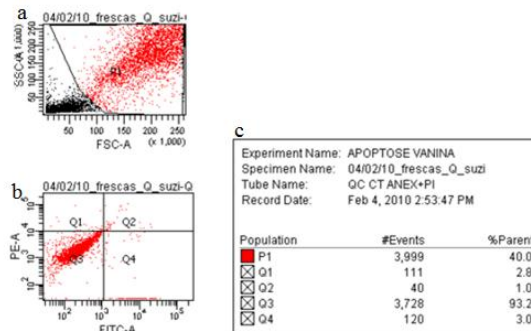
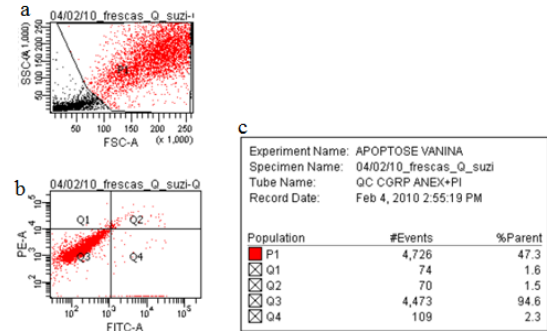


FIGURA 21 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queloide. QPele. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) Gate das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

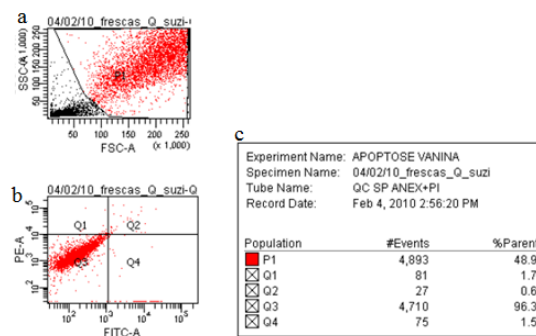
GRUPO QUELOIDE – QC
A - QC CONTROLE



B - QC CGRP



C - QC SP



D - QC CGRP + SP

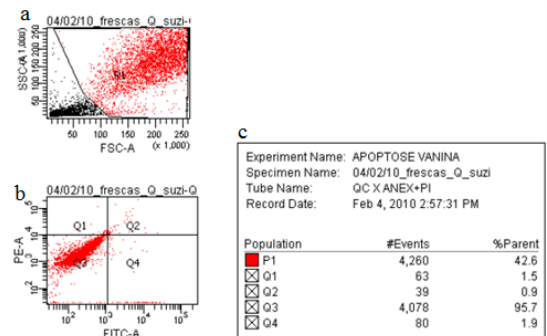
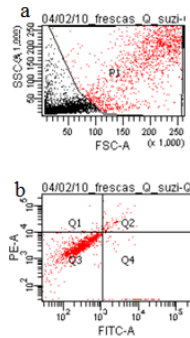


FIGURA 22 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queloide. QC. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) Gate das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

GRUPO QUELOIDE – QPF
A - QPF CONTROLE

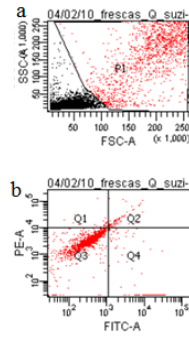


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
Specimen Name: 04/02/10_frescas_Q_suzi
Tube Name: QPF CT ANEX+PI
Record Date: Feb 4, 2010 3:02:24 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	1,737	17.4
☒ Q1	135	7.8
☒ Q2	70	4.0
☒ Q3	1,443	83.1
☒ Q4	89	5.1

B - QPF CGRP

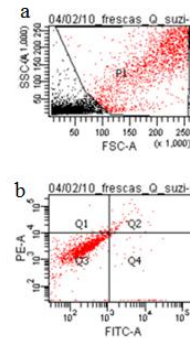


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
Specimen Name: 04/02/10_frescas_Q_suzi
Tube Name: QPF CGRP ANEX+PI
Record Date: Feb 4, 2010 3:04:06 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	1,876	18.8
☒ Q1	134	7.1
☒ Q2	74	3.9
☒ Q3	1,537	81.9
☒ Q4	131	7.0

C - QPF SP

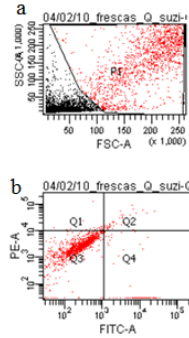


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
Specimen Name: 04/02/10_frescas_Q_suzi
Tube Name: QPF SP ANEX+PI
Record Date: Feb 4, 2010 3:05:47 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	2,039	20.4
☒ Q1	128	6.3
☒ Q2	54	2.6
☒ Q3	1,785	87.5
☒ Q4	72	3.5

D - QPF CGRP + SP



c

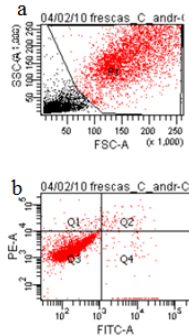
Experiment Name: APOPTOSE VANINA
Specimen Name: 04/02/10_frescas_Q_suzi
Tube Name: QPF X ANEX+PI
Record Date: Feb 4, 2010 3:07:19 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	1,775	17.8
☒ Q1	84	4.7
☒ Q2	42	2.4
☒ Q3	1,562	88.0
☒ Q4	87	4.9

FIGURA 23 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Queloide. QPF. A - Controle; B – CGRP; C – SP; D – CGRP + SP. (a) Gate das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

GRUPO CICATRIZ NORMOTRÓFICA E PELE ADJACENTE À CICATRIZ
 CP – CONTROLE PELE ADJACENTE À CICATRIZ
 CC –CICATRIZ NORMOTRÓFICA

A - CP CONTROLE

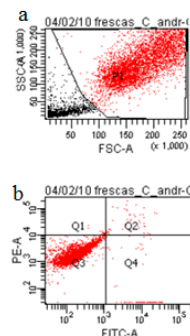


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CP CT ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:27:47 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	4,423	44.2
☒ Q1	187	4.2
☒ Q2	89	2.0
☒ Q3	3,959	89.5
☒ Q4	188	4.3

B - CP CGRP

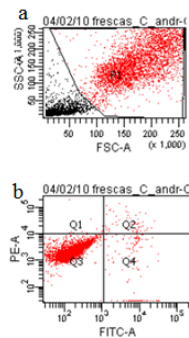


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CP CGRP ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:29:31 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	5,055	50.6
☒ Q1	80	1.6
☒ Q2	50	1.0
☒ Q3	4,811	95.2
☒ Q4	114	2.3

C - CP SP

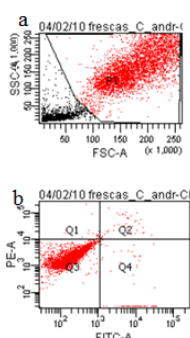


c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CP SP ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:31:27 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	3,880	38.8
☒ Q1	121	3.1
☒ Q2	56	1.4
☒ Q3	3,555	91.6
☒ Q4	148	3.8

D - CP CGRP + SP



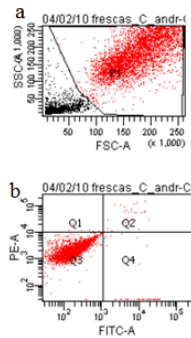
c

Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CP X ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:33:53 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	4,685	46.8
☒ Q1	123	2.6
☒ Q2	44	0.9
☒ Q3	4,402	94.0
☒ Q4	116	2.5

FIGURA 24 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Cicatriz. CP. A - Controle; B –CGRP; C –SP; D –CGRP + SP. (a) Gate das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

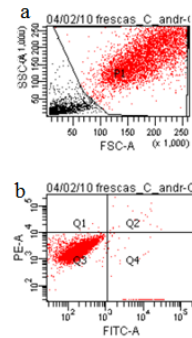
A - CC CONTROLE



Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CC CT ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:38:46 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	5,386	53.9
☒ Q1	98	1.8
☒ Q2	27	0.5
☒ Q3	5,192	96.4
☒ Q4	69	1.3

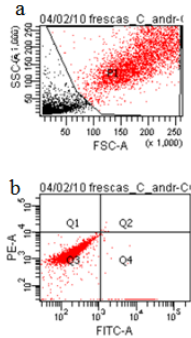
B - CC CGRP



Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CC CGRP ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:40:24 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	5,237	52.4
☒ Q1	181	3.5
☒ Q2	22	0.4
☒ Q3	4,908	93.7
☒ Q4	126	2.4

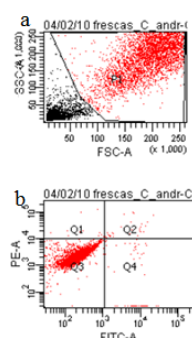
C - CC SP



Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CC SP ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:43:51 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	3,725	37.2
☒ Q1	1	0.0
☒ Q2	6	0.2
☒ Q3	3,501	94.0
☒ Q4	217	5.8

D - CC CGRP + SP



Experiment Name: APOPTOSE VANINA
 Specimen Name: 04/02/10 frescas_C_andr
 Tube Name: CC X ANEX+PI
 Record Date: Feb 4, 2010 3:46:40 PM

Population	#Events	%Parent
■ P1	4,570	45.7
☒ Q1	108	2.4
☒ Q2	27	0.6
☒ Q3	4,362	95.4
☒ Q4	73	1.6

FIGURA 25 – Viabilidade celular pelo iodeto de propídeo. Grupo Cicatriz. CC. A - Controle; B –CGRP; C –SP; D –CGRP + SP. (a) *Gate* das células a serem analisadas, em função do tamanho e complexidade. (b) Gráfico mostrando o resultado da citometria e os quadrantes Q1 a Q4, segundo a marcação com PI, anexina, ambos ou nenhum. (c) Valores numéricos correspondentes à distribuição encontrada nos quadrantes, por número de eventos ou percentual, sendo P1 a população total considerada.

Apêndice 11

Atividade Celular por MTT de Fibroblastos de Cicatriz Normotrófica ao Longo do Tempo

Esse experimento foi realizado apenas uma vez, e seus resultados estão descritos aqui em caráter ilustrativo. Sabemos que será necessário repeti-lo pelo menos duas vezes com células de pacientes diferentes antes de se fazer qualquer afirmação acerca dos resultados.

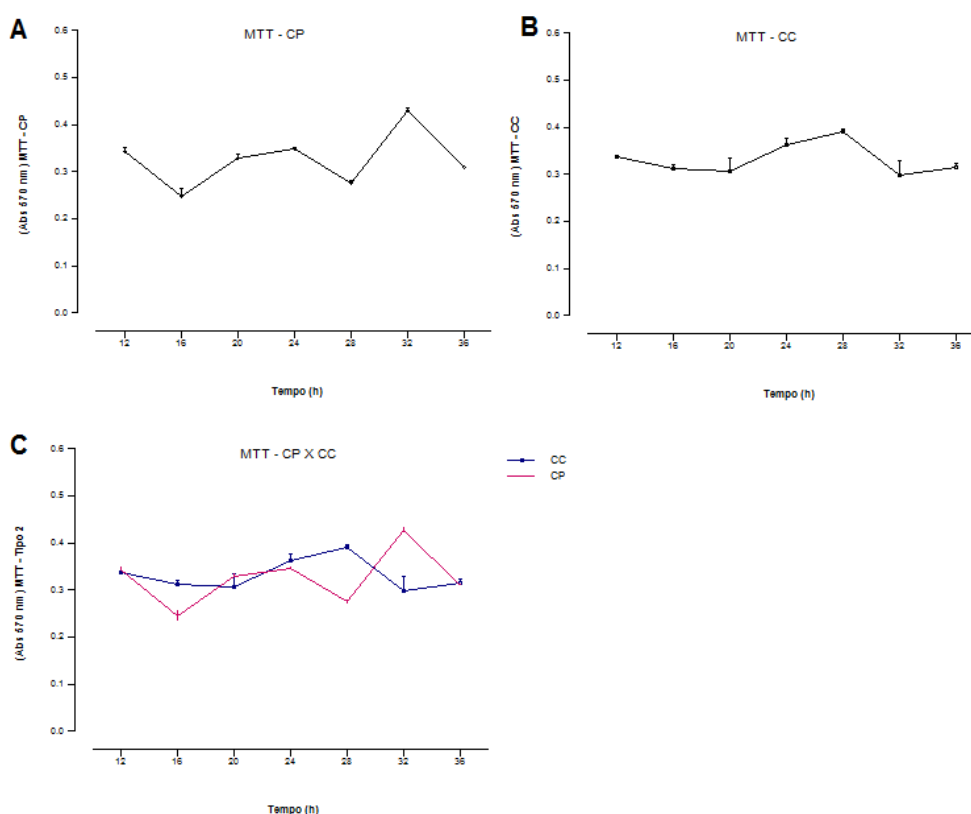


FIGURA 26 – Atividade celular por MTT ao longo do tempo. Grupo Cicatriz. (A) CP. (B) CC. (C) CP x CC. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (A-B) e 2-way Anova, seguido do pós-teste de Bonferroni (C) sem marcação nos gráficos (nível de significância: $p < 0,05$). Os

valores representam a média \pm erro padrão de células de 1 paciente (n=1) em cada gráfico, semeadas em triplicata.

Na figura 10 (A), todos os pontos apresentaram diferenças significantes entre si com exceção de: 36 vs 24, 36 vs 20, 36 vs 12. 20 vs 24, 20 vs 12 e 12 vs 24 horas.

Na figura 10 (B) apresentaram diferenças significantes entre si os seguintes pontos: 16, 20, 32 e 36, todos apenas em relação ao ponto 28 horas.

A figura 10 (C) mostra a sobreposição das curvas para fins comparativos. Os testes 2-way Anova, seguidos do pós-teste de Bonferroni para (C) apontaram diferença significativa ($p < 0.01$) na atividade de CP em relação a CC no ponto 16 horas, e significativa ($p < 0.001$) nos pontos 28 e 32. A atividade de CP oscilou mais ao longo do tempo do que a atividade de CC, que apresentou menos pontos de alteração.

FONTES CONSULTADAS

- Erdmann WS. Geometric and inertial data of the trunk in adult males. J Biomech. 1997;30(7):679-88.