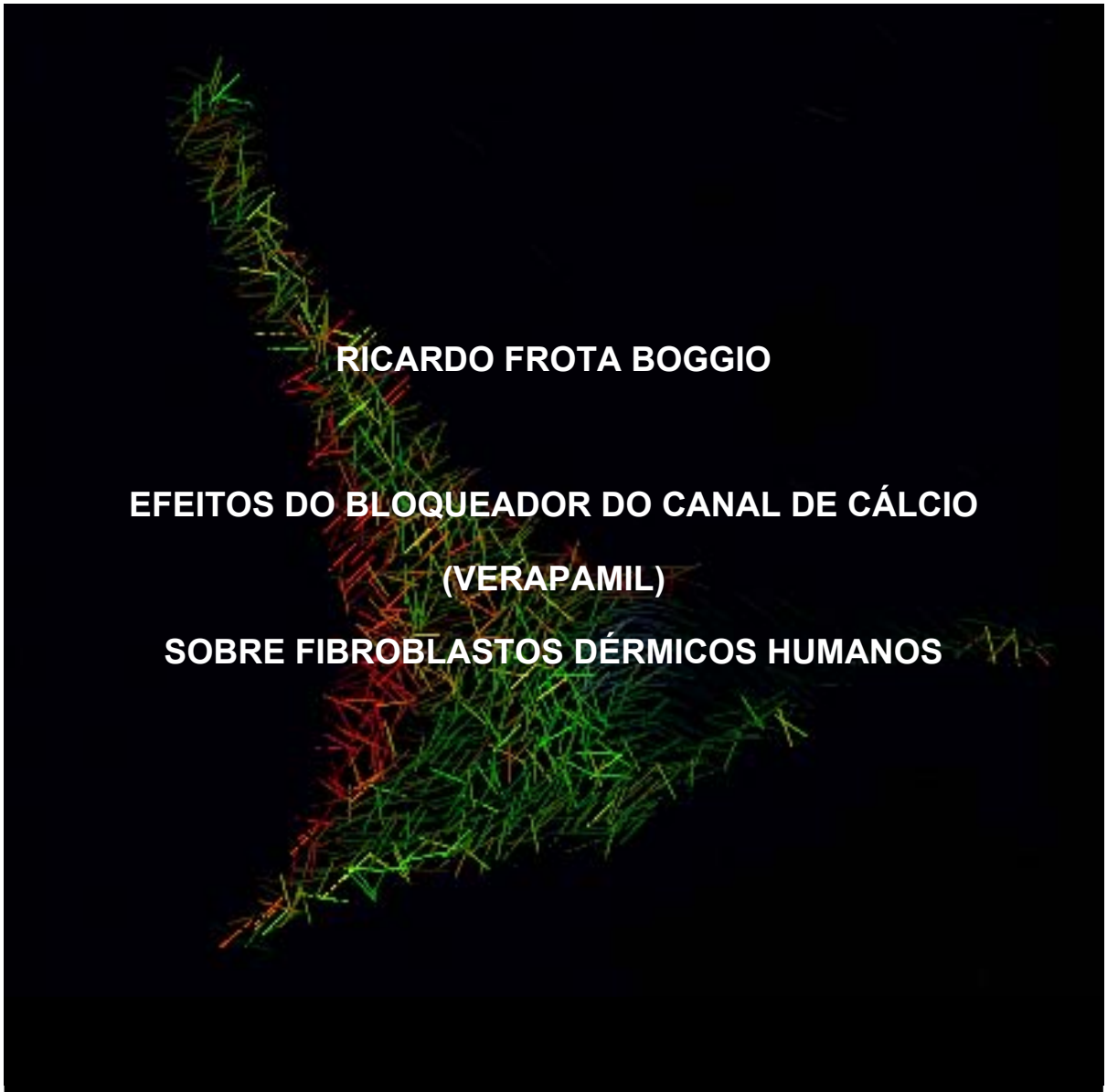

RICARDO FROTA BOGGIO

EFEITOS DO BLOQUEADOR DO CANAL DE CÁLCIO (VERAPAMIL) SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

São Paulo

2008

RICARDO FROTA BOGGIO

EFEITOS DO BLOQUEADOR DO CANAL DE CÁLCIO (VERAPAMIL) SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Biologia Celular e Tecidual. Orientação: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli.

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Boggio, Ricardo Frota.
Efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos / Ricardo Frota Boggio. - São Paulo, 2008.

Orientadora: Gláucia Maria Machado-Santelli.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia Celular e Molecular.

Versão do título para o inglês: Effects of calcium channel blocker (verapamil) on human dermal fibroblasts.

Descritores 1. Verapamil 2. Cálcio citosólico 3. Fibroblastos humanos 4. Colagenase 5. Colágeno 6. Actina I. Machado-Santelli, Gláucia Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB045/2008

Autorização para Reprodução

Para fins acadêmicos e científicos ( ) **está autorizada**, a partir de ____/____/____ a reprodução ( ) total ou ( ) parcial por processos fotocopiadores e a partir de ____/____/____ a disponibilização ( ) total ou ( ) parcial em meios eletrônicos.

Se parcial, discriminar paginação, ilustração, etc.

_____

_____

_____

_____

( ) **não está autorizada**

Assinatura do Autor: _____

Assinatura do Orientador: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Ricardo Frota Boggio

Tese: Efeitos do bloqueador de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos

Orientadora: Gláucia Maria Machado-Santelli

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado **( ) Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Regina e Agostinho,
pelo sopro da vida, por todo amor e apoio.
Aos meus irmãos Luciana e Leonardo,
pela partilha e contínuo companheirismo.
À minha esposa Ivana,
por seu imenso amor, carinho e entendimento.
À minha filhinha Luiza,
simplesmente pela sua existência.
À nossa sementinha,
pelo motivo de viver.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli por seu apoio, incentivo, compreensão, orientação e, principalmente, por sua amizade.

À Vanessa Morais Freitas pelo seu cientificismo, dedicação, solicitude e amizade.

À Flavia Cassiola pela sua colaboração no desenvolvimento do estudo.

Ao Marcel Kobayashi pelo apoio, colaboração e dedicação.

À Nara dos Santos pela sua amizade e disposição.

À Profa. Marisa Roma Herson, pela oportunidade e colaboração.

Ao Dr. André Oliveira Paggiaro pela amizade, apoio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Cesar Isaac pelo incentivo, atenção e colaboração.

Ao Roberto Cabado Modia pelo apoio, amizade e dedicação na aquisição e edição das imagens.

Ao Edson Rocha de Oliveira pela simpatia e prontidão na revelação das fotomicrografias.

À D. Nancy, por ter dado condição para realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório Amanda, Beatriz Brandão, Beatriz Cortez, Camila, Evandro, Fábio, Jônatas, Marisa, Marisa Rangel, Marisinha, Mingau, Paula, Rafael, Raquel, Rita, Paula e Stefânia pelos momentos agradáveis.

À Celiana, secretária da pós-graduação, pela atenção dispensada, coordenação e carinho.

Às bibliotecárias pela presteza, atenção e apoio.

Ao Dr. Aulus de Mendonça Albano pela oportunidade, ensino, apoio e caráter.

Ao Dr. Adolpho Ribeiro Carlucci pelo ensino, exemplo e acolhida.

As minhas avós, que tanto amo, Maria Aparecida e Rina (em memória) pelas orações e enorme carinho.

Aos meus Tios Edmar e Veridiana, João e Maristela, Ângelo e Lalinha pelo carinho e apoio.

À minha querida sobrinha Helena e afilhada Gabriela pelo brilho e alegria.

Aos meus sogros Ana e Ivan pelo carinho e, especialmente, pela esposa que permitiram que tivesse.

Às minhas cunhadas e aos meus cunhados pela amizade fraterna.

Aos meus amigos (irmãos) e colegas de trabalho pela valorização e carinho.

À FAPESP, CAPES, e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, à Deus, por permitir que tudo isso acontecesse e pelo imenso prazer que é viver amparado por Suas mãos.

“Eu cuidei da ferida. Deus a curou.”
Ambroise Paré

RESUMO

BOGGIO, R.F. **Efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos.** X f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O excesso de tecido cicatricial (quelóides e cicatrizes hipertróficas) é um defeito do processo de cicatrização das feridas, caracterizado por um aumento na produção da matriz extracelular. No presente estudo, fibroblastos dérmicos humanos tratados com 50 μM verapamil tiveram sua morfologia alterada, passando de fusiformes para estrelados/arredondados, além de apresentarem discreta reorganização dos filamentos de actina. Consideramos que estas alterações possam estar associadas a baixos níveis de cálcio citosólico. Esta hipótese foi confirmada através marcação de fibroblastos tratados com calcium green. Observamos também, que o verapamil inibiu a proliferação celular em 64,4%, aumentou a secreção de MMP1 e diminuiu a síntese de colágeno em fibroblastos em cultura. Estas alterações induzidas pelo verapamil não estão associadas a efeitos citotóxicos. Concluímos que o metabolismo celular do cálcio está aparentemente relacionado a produção da matriz extracelular e que as patologias hipertróficas da cicatrização (quelóides e cicatrizes hipertróficas) podem responder ao tratamento com bloqueadores do canal de cálcio (verapamil).

Descritores: Verapamil, Cálcio citosólico, Fibroblastos humanos, Colagenase, Actina.

ABSTRACT

BOGGIO, R.F. **Effects of calcium channel blocker (verapamil) on human dermal fibroblasts.** X f. Ph. D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Excessive scar tissue (keloids and hypertrophic scars) is a defective wound healing process characterized by overproduction of extracellular matrix. In the present study human dermal fibroblasts treated with 50 μM verapamil changed their normal spindle-shaped morphology to stellate/rounded and showed discrete reorganization of actin filaments. We hypothesized that these effects would be associated to lower levels of cytosolic Ca^{2+}. Indeed, short time loading with calcium green confirmed that verapamil-treated fibroblasts exhibited lower intracellular calcium levels. We also observed that verapamil decrease cellular proliferation by 64,4%, increase the secretion of MMP1 and decrease synthesis of collagen in cultured fibroblasts. This alterations induced by verapamil are not associated with cytotoxic effects. We conclude that cellular calcium metabolism appears to regulate extracellular matrix production and those hypertrophic disorders of wound healing (keloids and hypertrophic scars) may respond to therapy with calcium antagonist drugs (verapamil).

Keywords: Verapamil, Cytosolic calcium, Human fibroblasts, Collagenase, Actin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografia de explante de pele humana..... 59

Figura 2 – Aspectos morfológicos de fibroblastos submetidos a 10 μM e 100 μM de verapamil..... 60

Figura 3 – Aspectos morfológicos de fibroblastos submetidos à incubação com 50 μM verapamil..... 62

Figura 4 – Curvas de crescimento de fibroblastos controles e tratados..... 63

Figura 5 – Efeito do verapamil sobre a proliferação dos fibroblastos..... 65

Figura 6 – Imagens fluorescentes do padrão de incorporação de BrdU.....66

Figura 7 – Índice de células na fase S (BrdU)..... 67

Figura 8 – Teste de viabilidade celular por azul de trypan..... 68

Figura 9 – Teste de viabilidade celular por imunofluorescência..... 69

Figura 10 – Índice de viabilidade por imunofluorescência..... 70

Figura 11 – Imagens fluorescentes do padrão de organização dos filamentos de actina..... 72

Figura 12 – Reconstrução 3D ao microscópio confocal de varredura a laser de fibroblastos controles e tratados..... 73

Figura 13 – Imagens fluorescentes do padrão de organização dos microtúbulos.... 75

Figura 14 – Imagens fluorescentes do padrão de organização da vimentina..... 77

Figura 15 – Imagens fluorescentes da vinculina associada aos contatos focais..... 79

Figura 16 – Fotomicrografia de imunofluorescência da vinculina em maior aumento.....81

Figura 17 – Imagens fluorescentes de fibroblastos marcados com *calcium green*....82

Figura 18 – Imagens fluorescentes da membrana e do núcleo de fibroblastos submetidos ao *calcium green*..... 83

Figura 19 – Análise da intensidade de fluorescência de fibroblastos marcados com *calcium green*..... 85

Figura 20 – Análise da intensidade de fluorescência do *calcium green* através do módulo *profile* do microscópio confocal..... 87

Figura 21 – Análise da intensidade de fluorescência do *calcium green* através do módulo *histogram analysis* do microscópio confocal..... 88

Figura 22 – Análise da intensidade de fluorescência do *calcium green* através do módulo *pseudo 3D* do microscópio confocal..... 89

Figura 23 – Micrografias ao microscópio invertido de contraste de fase de fibroblastos submetidos a meios com diferentes concentrações de cálcio..... 91

Figura 24 – Zimografia de caseína do meio condicionado..... 93

Figura 25 – Ensaio de atividade da colagenase..... 94

Figura 26 – “Immunoblot” (colagenase) do meio condicionado e do lisado de células..... 95

Figura 27– Análise por imunofluorescência da biossíntese de colágeno I..... 96

Figura 28 – Análise por imunofluorescência da biossíntese de procolágeno I..... 97

Figura 29 – “Immunoblot” (colágeno) do lisado de fibroblastos..... 98

Figura 30 – Avaliação macroscópica da contração do gel de colágeno..... 99

Figura 31 – Análise percentual da contração do gel de colágeno..... 100

Figura 32 – Análise por HE do gel de colágeno..... 102

Figura 33 – Análise por imunofluorescência do citoesqueleto de fibroblastos no gel de colágeno..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proliferação celular expressa em número de células/mL..... 64

Tabela 2 – Porcentagem de contração do gel de colágeno..... 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aC	antes de Cristo
AMPc	5`-monofosfato de adenosina cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BrdU	bromodesoxiuridina
^{o}C	graus Celsius
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
CH	cicatriz hipertrófica
cm	centímetro
cm^2	centímetro quadrado
CO_2	gás carbônico
Cy5	reativo fluorescente da família das cyanines
C-terminais	extremidades carboxiterminais
D	dalton
DAG	diacilglicerol
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DilC18	lipoproteína de baixa densidade
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	di-metil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
EGF	fator de crescimento epidérmico
FITIC	fluoresceína

g	grama
μg	micrograma
GDP	difosfato de guanosina
GTP	5`-trifosfato de guanosina
GTPase	enzima que cliva 5`-trifosfato de guanosina
HE	hematoxilina-eosina
HRP	enzima peroxidase de raiz forte
Hz	hertz
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina
IL-I	interleucinas I
IP3	inositol trifosfato
K	quelóide
Kg	quilograma
Tipo-L/N/P/Q/R/T	canais voltagem dependentes
μL	microlitro
M	molar
μM	micromolar
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
mL	mililitro
MMPs	metaloproteinases
Nm	nanômetro
NaCl	cloreto de sódio
NaN_3	azida de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
N-terminais	extremidades aminoterminais
OH	hidroxila
PBSA	tampão fosfato salino sem cálcio e magnésio
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
pH	cologarítmo da concentração hidrogeniônica
PIP3	fosfatidil inositol trifosfato
REG	retículo endoplasmático granular
Rnase	enzima que catalisa a hidrólise do RNA
RNAm	ácido ribonucléico-mensageiro
rpm	rotações por minuto
S	segmentos homólogos
SDS	sulfato dodecil sódico
SFB	soro fetal bovino
TEMED	tetrametiletilenodiamino
TGF- β	fator-β transformador do crescimento
TIMP	inibidor de protease
TRITIC	fluoresceína
v	velocidade

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
У	gama
ω	ômega
%	sinal matemático que indica porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 23

1.1 REPARAÇÃO TECIDUAL NORMAL..... 23

1.1.1 HEMOSTASIA E INFLAMAÇÃO..... 23

1.1.2 PROLIFERAÇÃO..... 24

1.1.3 MATURAÇÃO E REMODELAGEM..... 26

1.1.4 TECIDO DE GRANULAÇÃO..... 26

1.2 REPARAÇÃO TECIDUAL PATOLÓGICA..... 28

1.3 SÍNTESE DE COLÁGENO..... 31

1.4 COLAGENASE..... 33

1.5 CITOESQUELETO..... 35

1.6 CÁLCIO CITOSÓLICO..... 37

1.7 CANAIS DE CÁLCIO..... 39

1.8 BLOQUEADORES DO CANAL DE CÁLCIO..... 41

2 OBJETIVOS..... 44

3 MATERIAL E MÉTODOS 45

3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS..... 45

3.2 TRATAMENTO COM A DROGA..... 45

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO..... 46

3.4 INCORPORAÇÃO DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU)..... 46

3.5 TESTE DE VIABILIDADE POR AZUL DE TRYPAN..... 47

3.6 TESTE DE VIABILIDADE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA..... 48

3.7 ANÁLISE DO CITOESQUELETO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA..... 48

3.8 ANÁLISE DOS CONTATOS FOCAIS..... 49

3.9 MARCAÇÃO DO NÚCLEO E MEMBRANA PLASMÁTICA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA..... 49

3.10 DETECÇÃO E ANÁLISE DO CÁLCIO INTRACELULAR..... 50

3.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA COLAGENASE..... 50

3.12 ZIMOGRAFIA DE CASEÍNA..... 51

3.13 "IMMUNOBLOT" DA COLAGENASE..... 52

3.14 ANÁLISE DO COLÁGENO E PROCOLÁGENO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA..... 53

3.15 "IMMUNOBLOT" DO COLÁGENO..... 54

3.16 INCLUSÃO DOS FIBROBLASTOS E POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO..... 54

3.17 AVALIAÇÃO DOS FIBROBLASTOS POVOADOS EM GEL DE COLÁGENO POR HEMATOXILINA-EOSINA (HE)..... 55

3.18 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTRAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO..... 55

3.19 ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DOS FIBROBLASTOS EM GEL DE COLÁGENO..... 56

3.20 ANÁLISE AO MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARREDURA A LASER..... 56

3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 57

3.22 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... 57

4 RESULTADOS..... 58

4.1 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CURTA DURAÇÃO.....……..... 58

4.2 FIBROBLASTOS EM CULTURA TRATADOS COM O VERAPAMIL..... 59

4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR..... 63

4.3.1 CURVA DE CRESCIMENTO..... 63

4.3.2 INCORPORAÇÃO DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU)..... 65

4.4 VIABILIDADE CELULAR..... 67

4.4.1 TESTE DE VIABILIDADE POR AZUL DE TRYPAN..... 67

4.4.2 TESTE DE VIABILIDADE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA..... 68

4.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO VERAPAMIL SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS..... 70

4.5.1 MICROFILAMENTOS..... 70

4.5.2 MICROTÚBULOS..... 74

4.5.3 FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS..... 76

4.6 CONTATOS FOCAIS..... 78

4.7 CÁLCIO..... 82

4.7.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA..... 82

4.7.2 ANÁLISE DA DINÂMICA DA FLUORESCÊNCIA..... 86

4.7.3 INCUBAÇÃO DOS FIBROBLASTOS COM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO..... 90

4.8 COLAGENASE..... 92

4.8.1 ZIMOGRAFIA DE CASEÍNA..... 92

4.8.2 ATIVIDADE DA COLAGENASE..... 94

4.8.3 "IMMUNOBLOT"..... 95

4.9 COLÁGENO E PROCOLÁGENO..... 95

4.10 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO VERAPAMIL SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS EM CULTURA 3D (GEL DE COLÁGENO)..... 98

4.10.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTRAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO..... 98

4.10.2 ANÁLISE POR HEMATOXILINA-EOSINA (HE)……..… 101

4.10.3 ANÁLISE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA....…….....103

5 DISCUSSÃO 105

6 CONCLUSÕES..... 117

REFERÊNCIAS..... 118

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de uma lesão cutânea desencadeia uma cascata organizada e complexa de eventos celulares e bioquímicos, que resultam em uma ferida cicatrizada. A cicatrização pode ser dividida em três fases distintas, porém superpostas, hemostasia e inflamação, proliferação, maturação e remodelagem. Qualquer falha no processo cicatricial pode resultar em ausência de fechamento da ferida, retardo da cicatrização ou no desenvolvimento de cicatrizes patológicas, como quelóides e cicatrizes hipertróficas (McCARTHY, 1990; WITTE et al., 1997).

1. 1 REPARAÇÃO TECIDUAL NORMAL

1.1.1 HEMOSTASIA E INFLAMAÇÃO

A perda da integridade tecidual envolve a ruptura de vasos e a conseqüente exposição do colágeno subendotelial as plaquetas. Estas, por sua vez, se agregam formando um coágulo, promovendo a hemostasia e liberando grânulos ricos em fibronectina plasmática, serotonina e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). A fibronectina aumenta a adesão dos fibroblastos ao tecido em cicatrização, a serotonina aumenta a permeabilidade capilar e o PDGF estimula a proliferação dos fibroblastos e a produção do tecido conjuntivo. A inflamação é essencial ao processo cicatricial, sendo caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia das células da circulação para o interior da ferida e liberação local de citocinas e de fatores de crescimento (McCARTHY, 1990; WITTE et al., 1997; BRADDOCK, 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a ferida, sendo responsáveis pela remoção de corpos estranhos e do tecido desvitalizado. Sua ação máxima ocorre em torno do segundo dia da cicatrização. A liberação inicial e transitória de fatores provenientes das plaquetas é um primeiro estímulo poderoso na ativação dos macrófagos, células estas, primordiais na cicatrização por promoverem a fagocitose, a angiogênese e a coordenação da migração, bem como a ação dos fibroblastos. Os macrófagos atingem sua maior concentração na ferida em torno do terceiro dia da cicatrização. Os linfócitos, o último tipo celular a migrar para a ferida, liberam interleucinas (IL-I) e y-interferon, substâncias importantes na resposta imune e na proliferação dos fibroblastos. A ação máxima dos linfócitos ocorre em torno do sexto dia de cicatrização. A invasão celular acarreta a lise do coágulo e as células começam a sintetizar fibronectina celular. A fibronectina e os produtos de seu fracionamento apresentam propriedades quimiotaxicas e adesivas, estimulando a proliferação da matriz extracelular. A fase inflamatória estende-se da ocorrência da lesão ao sexto dia de cicatrização (WITTE et al., 1997; DIEGELMANN et al., 2004).

1.1.2 PROLIFERAÇÃO

A segunda fase da cicatrização, conhecida como proliferação, caracteriza-se pela presença dos fibroblastos, que migram para o interior da ferida a partir do tecido circundante, sendo estes os responsáveis pela produção do colágeno, proteína de grande importância na matriz extracelular. Witte et al., em 1997, descreveram que os fibroblastos que derivam da ferida passam por alterações fenotípicas, influenciados principalmente pelas citocinas derivadas dos macrófagos, caracterizando-se por

maior síntese de colágeno e contração, porém com menor proliferação, em comparação com os fibroblastos dérmicos normais. Além dos fibroblastos é possível encontrar na fase proliferativa as células endoteliais, responsáveis pela angiogênese, e os miofibroblastos, responsáveis pela aproximação das bordas da ferida (contração) (GRINNEL, 1994). Os miofibroblastos originam-se a partir dos fibroblastos, células musculares lisas, pericitos e de algumas células do estroma, após estas células terem passado por alterações fenotípicas induzidas por fatores do meio ambiente da ferida. Entre o 8º e 15º dias de cicatrização, os miofibroblastos apresentam-se em número elevado, quando então, progressivamente regridem, praticamente desaparecendo em torno do 30º dia. O mecanismo responsável por essa redução no número de células é a apoptose (SCHÜRCH et al., 1998). Os três elementos essenciais que definem os miofibroblastos são: a presença de fibras de estresse (α-actina), sítios de ligação estroma-célula bem desenvolvidos (fibronexus) e junções comunicantes e intercelulares bem definidas. (DARBY et al., 1990; SCHÜRCH et al., 1998; ALBERTS, 2004).

As células epiteliais começam a proliferar poucos dias após a ocorrência da lesão, a partir das bordas da ferida ou de ilhas epiteliais (não-lesadas) dentro da ferida, estimuladas pelas citocinas e fatores de crescimento liberados, principalmente, pelos macrófagos. A proliferação das células epiteliais recebe influência direta da concentração de íons inorgânicos no tecido em cicatrização, a presença de níveis elevados de cálcio inibe a quimiotaxia e a adesão do queratinócitos a ferida. A fase fibroproliferativa inicia-se em torno do segundo ou terceiro dia após o trauma, estendendo-se até o 14º dia da cicatrização (FALANGA et al., 1988; WITTE et al., 1997; VIENNET et al., 2003; DIEGELMANN et al., 2004).

1.1.3 MATURAÇÃO E REMODELAGEM

A fase de maturação e remodelagem, terceira fase da cicatrização, caracteriza-se pela deposição de colágeno na ferida. Com a rápida eliminação da maior parte de fibronectina, por ação de proteinases, e com o acúmulo gradual de feixes de colágeno tipo I, que aumentam a força tensora da cicatriz, esta fase destaca-se por sua grande importância clínica. A resistência da cicatriz aumenta progressivamente. Após uma semana representa cerca de 3% da resistência da pele intacta. Após 3 semanas 20% e após 3 meses 80%, não apresentando nenhum aumento adicional daí em diante. A composição e estrutura da matriz extracelular mudam constantemente desde o início de sua formação. A matriz extracelular é depositada, primeiramente nas margens da ferida, sobre o tecido de granulação, e a deposição na região central dá-se tempo depois de ter ocorrido na periferia. Desta maneira, a composição e estrutura da matriz extracelular do tecido de granulação dependem do tempo decorrente desde a agressão, bem como da distância entre as margens da ferida. A terceira fase da cicatrização inicia-se em torno do 8º dia após o trauma, estendendo-se até 1,5 anos (FALANGA et al., 1988; WITTE et al., 1997; DIEGELMANN et al., 2004).

1.1.4 TECIDO DE GRANULAÇÃO

Com o objetivo de se conseguir uma ótima cicatrização, a adequada formação do tecido de depende do equilíbrio entre a biossíntese e a degradação da matriz extracelular. A síntese excessiva de colágeno pelos fibroblastos e a degradação e remodelagem deficientes da matriz extracelular, pela colagenase, podem dar origem

a lesões dérmicas tipo quelóides e cicatrizes hipertróficas (DESMOULIÈRE et al., 1995; CHODOROWSKA et al., 2004; BAUM et al., 2005; WERNER et al., 2007).

Com a desgranulação das plaquetas, ocorre a liberação do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e de uma série de outros potentes fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e o fator-β de crescimento de transformação (TGF- β), os quais funcionam como agentes quimiotáxicos para o recrutamento de células inflamatórias (BRADDOCK, 2002). Distúrbios na função plaquetária, assim como o prolongamento do processo inflamatório aumentam a chance de desenvolvimento dos distúrbios fibroproliferativos, por incremento na produção do tecido de granulação. As interleucinas (IL-I), em conjunto com y-interferon e com o fator de necrose tumoral-α, induzem a liberação e ativação das metaloproteinases (MMP). Uma diminuição nos níveis das interleucinas pode levar a um maior acúmulo de matriz extracelular. O aumento de imunoglobulinas E pode estimular as células a liberar grânulos contendo histaminas. A histamina é capaz de induzir a um aumento na produção de colágeno pelos fibroblastos, incrementando a formação do tecido de granulação (STEED, 1997; CONSTANTIN et al., 2002; AKASAKA et al., 2004).

A formação do tecido de granulação e, conseqüentemente, o fechamento da ferida, estão intimamente relacionados às interações existentes entre fibrina, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno (WITTE et al., 1997). Os fibroblastos nos distúrbios fibroproliferativos, em contraste com os fibroblastos dérmicos da pele intacta, têm dificuldade em mediar a fibrinólise, uma vez que exibem níveis mais baixos de ativador do plasminogênio e elevados níveis de inibidor de atividade, o que resulta em uma baixa concentração de plasmina

(GRINNEL et al., 1982; HYNES et al., 1995; TUAN et al., 1996) O ácido hialurônico é parte importante da matriz extracelular, caracterizando-se como um abundante componente do tecido de granulação recém formado, que reduz aos níveis normais 5 a 10 dias após o início da cicatrização. Nos distúrbios fibroproliferativos há um aumento na concentração de ácido hialurônico, o que contribui para o aumento do volume do tecido cicatricial (LINARES et al., 1978). O excesso de microvasos no tecido cicatricial estimula a proliferação dos fibroblastos e, consequentemente, a síntese de colágeno, levando a uma produção excessiva de tecido de granulação (PRICE, et al., 2005; VOINCHET et al., 2006).

1. 2 REPARAÇÃO TECIDUAL PATOLÓGICA

O excesso de tecido cicatricial foi descrito pela primeira vez nos papiros de Smith em torno de 1700 aC. No entanto, Baron Jean Louis Alibert, em 1806, foi o primeiro a discutir este assunto. Chamando inicialmente o excesso de tecido cicatricial de cancróide, Alibert alterou posteriormente seu nome para quelóide, a fim de evitar uma conotação cancerígena. A palavra quelóide deriva do grego *chele*, que significa garra de caranguejo, e do sufixo - *oide*, ou forma de. Os Olmecas do México, na era pré-colombiana, utilizavam a escarificação como meio de decoração dos seus corpos. Na era moderna, mulheres da Núbia, no Sudão, são intencionalmente escarificadas com quelóides faciais como forma de decoração. Como parte de um ritual, os nativos de Papua-Nova Guiné realizam incisões na pele e inserem barro ou cinzas no interior das feridas, a fim de induzir a formação de quelóides. Este ritual doloroso torna-os membros respeitados da sua comunidade

tribal, sendo honrados pela sua coragem e resistência (LAWRENCE, 1987; DOYLE-LLOYD et al., 1991; BERMAN et al., 1995; NIESSEN et al., 1999).

O quelóide caracteriza-se por ser uma lesão fibrosa elevada, que se estende além das margens das feridas de origem e, raramente, regride. Desenvolve-se em média 3 meses após o trauma, ocorrendo, predominantemente, no lobo da orelha, ombros e tórax anterior. Sua ocorrência independe da mobilidade da área lesada, podendo pequenos traumas causar grandes lesões. Histologicamente os quelóides caracterizam-se por apresentar fibras colágenas grandes e espessas, compostas por numerosas fibrilas, apresentando poucos ou até mesmo nenhum fibroblasto positivo para α-actina (miofibroblasto) (RUSSELL et al., 1976; EHRLICH et al., 1994; ELLITSGAARD et al., 1997; NIESSEN et al., 1999).

As cicatrizes hipertróficas são lesões fibrosas, que tipicamente permanecem dentro dos limites da ferida original, sofrendo habitualmente resolução espontânea parcial, desenvolvendo-se, aproximadamente 4 semanas após o trauma. A cicatriz hipertrófica ocorre predominantemente nas superfícies flexoras, estando intimamente relacionada ao movimento da região afetada, sendo que, o tamanho da lesão está normalmente relacionado a gravidade do trauma. Histologicamente as cicatrizes hipertróficas caracterizam-se pela presença de pequenos vasos sanguíneos, fibras colágenas pequenas e desordenadamente agrupadas em nódulos, sendo comum a presença de miofibroblastos (RUSSELL et al., 1976; EHRLICH et al., 1994; ELLITSGAARD et al., 1997; NIESSEN et al., 1999).

Os quelóides desenvolvem-se exclusivamente em humanos, ocorrem igualmente em ambos os sexos, sendo mais comumente encontrados em negros, orientais e espânicos, não acometendo indivíduos albinos (NIESSEN et al., 1999).

Abergel et al., em 1985, descreveram que a incidência dos quelóides é desconhecida, referindo-se, no entanto, ao fato de que estudos com algumas populações africanas sugerem uma incidência de aproximadamente 6%. Ramakrishnan et al., em 1974, sugeriu a ocorrência de transmissão familiar conferida por gene de herança autossômica dominante.

História familiar, a resposta prévia exuberante à lesão, a inflamação prolongada, a localização da lesão, a idade entre 10 e 30 anos e a gravidez são alguns dos fatores preditivos ao desenvolvimento dos distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos (TREDGET et al., 1997; ENGLISH et al., 1999; NIESSEN et al., 1999).

Dor, prurido e queimação são sintomas presentes no quelóide e na cicatriz hipertrófica, podendo ser mais exacerbados nesta última (ENGLISH et al., 1999).

A morbidade sofrida pelos indivíduos com quelóides e cicatrizes hipertróficas vai de cosmética à sérias limitações do movimento (TREDGET et al., 1997; DEVLIN-ROONEY et al., 2005). Os muitos métodos propostos para o tratamento dos quelóides e cicatrizes hipertróficas incluem o uso de roupas compressivas, lâminas de gel de silicone, conformadores, crioterapia, radioterapia, corticosteróides, quimioterápicos, bleomicina, laser, cirurgia (TREDGET et al., 1997; ELLITSGAARD et al., 1997; NIESSEN et al., 1999; CHOWDRI et al., 1999; ENGLISH et al., 1999; LEBWOHL et al., 2000; ESPAÑA et al., 2001, GOLD et al., 2001; LEE et al., 2001; MANUSKIATTI et al., 2001; DEVLIN-ROONEY et al., 2005) e, recentemente, o uso intralesional de bloqueadores do canal de cálcio, como o verapamil (LEE, et al., 1994; LAWRENCE et al., 1996; DOONG et al., 1996; D`ANDREA, et al., 2002).

1.3 SÍNTESE DO COLÁGENO

O colágeno, sintetizado pelos fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos, condrócitos e células musculares lisas, é a proteína mais abundante do corpo humano, representando 30% da massa protéica total (KÜHN et al., 1985; WITTE et al., 1997).

A molécula de colágeno caracteriza-se por sua estrutura longa e rígida, com 300 nm de comprimento, 1,5 nm de diâmetro e peso de 95000 D, sendo formado por uma fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas, constituídas por mais de 1000 aminoácidos, denominadas cadeias α, encontram-se enroladas umas as outras (FIETZEH et al., 1976; KHÜN, 1985).

O colágeno é uma glicoproteína especialmente rica nos aminoácidos prolina e glicina e em aminoácidos modificados pela adição de grupamentos hidroxila (OH), como a hidroxiprolina e hidroxilisina. A glicina representa 33,5% dos aminoácidos que compõem a molécula de colágeno, enquanto que, a prolina e a hidroxiprolina representam 12 e 10%, respectivamente. Devido sua estrutura em anel, a prolina estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α, ao passo que, a glicina é espaçada regularmente a cada dois resíduos por toda região central da cadeia α, permitindo que as hélices se agrupem firmemente formando o colágeno. As extremidades amino e carboxiterminais das cadeias α são formadas por 16 a 25 resíduos dispostos de forma não-helicoidal, provavelmente devido à baixa concentração de glicina e aminoácidos (FURTHMAYR et al., 1976; ABERGEL et al., 1985; KHÜN, 1985).

Produzido no retículo endoplasmático granular do fibroblasto, a partir de informações fornecidas pelo RNAm (ácido ribonucléico-mensageiro), o colágeno é

secretado por exocitose na forma de procolágeno, o qual, no meio extracelular, sofre ação de enzimas proteolíticas (peptidases), que clivam a maior parte de seus peptídios de registro, transformando assim, o procolágeno em tropocolágeno. Posteriormente, os tropocolágenos ligam-se entre si formando as fibrilas colágenas, que por sua vez, formarão as fibras colágenas. As fibrilas iniciam sua formação próxima à superfície celular, freqüentemente nas invaginações da membrana plasmática formados pela fusão das vesículas secretoras com a superfície celular. O citoesqueleto cortical subjacente pode influenciar o local, a proporção e a orientação da reunião das fibrilas As moléculas de colágeno ligam-se longitudinalmente, estando dispostas de forma paralela nos feixes (ABERGEL et al., 1985; KHÜN, 1985; WITTE et al., 1997) .

Até o momento, cerca de 25 cadeias α de colágeno diferentes foram identificadas, cada uma codificada por um gene específico. Diferentes combinações desses genes são expressas em diferentes tecidos. Na pele, no tecido conjuntivo, há o predomínio de colágeno tipo I (80%) e de colágeno tipo III (20%). Durante a reparação da ferida o primeiro tipo de colágeno a aparecer é o tipo III, atingindo sua concentração máxima em torno do 2º ao 3º dia, seguido pelo tipo I, com maior concentração entre o 6º e o 7º dia. No colágeno I, duas das três cadeias peptídicas são iguais entre si (α-1) e uma é diferente (α-2). No colágeno III, as três cadeias peptídicas são α-1 (VON DER MARK et al., 1981; ABERGEL et al., 1985; TREDGET et al., 1997). Os quelóides e as cicatrizes hipertróficas apresentam maior quantidade de colágeno, quando comparados com a cicatriz e com a pele normal, estando esta diferença na proporção 3:1, permanecendo a quantidade de colágeno tipo III normalmente aumentada, quando comparada à quantidade relativa da pele e da cicatriz normal (DIEGELMANN et al., 1972; TREDGET et al., 1997; WITTE et al.,

1997). Ueda et al., em 1999, demonstraram em seus estudos que a síntese de colágeno está aumentada nos quelóides, nas cicatrizes hipertróficas e em culturas de fibroblastos de quelóides, relacionando esse aumento ao maior número de fibroblastos e aos níveis elevados de ATP. Ao analisar a síntese de colágeno por fibroblastos de quelóides em culturas, Abergel et al., 1985, notaram que em 5 de 9 culturas a síntese de procolágeno estava aumentada e que em 4 de 9 culturas a síntese estava normal. Os autores concluiram que estas observações foram importantes para demonstrar que a síntese de colágeno está aumentada em alguns, mas não em todos os quelóides. Rowe et al., 1978, Abergel et al., 1985 e Tredget et al., 1997, demonstraram em seus estudos que a elevada síntese de colágeno por fibroblastos de quelóides em cultura está relacionada a elevados níveis de RNAm nos fibroblastos. Apesar da maior incidência de quelóides em indivíduos negros, Diegelmann et al., 1972, descreveram não haver diferenças significativas na síntese de colágeno entre fibroblastos derivados de pele normal de pacientes negros e brancos.

1.4 COLAGENASE

A renovação regulada das macromoléculas da matriz extracelular é crucial para uma grande variedade de importantes processos biológicos. A proteólise das proteínas da matriz extracelular contribui para a migração celular de várias formas, abrindo caminhos na matriz, expondo sítios escondidos nas proteínas clivadas, promovendo o descolamento das células e liberando proteínas sinalizadoras extracelulares. Na pele, o aumento ou a diminuição da produção de colagenase pode contribuir para o aparecimento doenças dermatológicas como epidermólise

bolhosa, carcinomas basocelulares, cicatrizes hipertróficas e quelóides (PETERSEN et al., 1987; KNÄUPER et al., 1996). O colágeno é degradado pela colagenase, uma metaloprotease produzida, predominantemente, pelos fibroblastos. A colagenase cliva o colágeno num ponto 75 nm da extremidade carboxiterminal, gerando dois fragmentos de tripla-hélice, representados, respectivamente, por 75% e 25% da molécula original. A ação das proteases é restrita a áreas específicas pela secreção de inibidores de protease, como os TIMPs-inibidores. Esses inibidores são protease-específicos e ligam-se fortemente à enzima ativada, bloqueando sua atividade (AGGELER et al. 1984; ABERGEL et al., 1985; HE et al., 1989).

Tredget et al., em 1997, relataram que fibroblastos de cicatrizes hipertróficas demonstram uma quantidade reduzida de RNAm para colagenase, assim como reduções globais na capacidade de digerir o colágeno solúvel, em comparação com pares de fibroblastos normais. Relatou também, que os fibroblastos das cicatrizes hipertróficas apresentam uma síntese reduzida de óxido nítrico, um importante mediador da sinalização dos fatores de crescimento que se destaca por seus efeitos antiproliferativos e antimicrobianos.

Abergel et al., em 1985, descreveram em seus estudos que a diminuição na degradação da matriz extracelular de lesões queloideanas não se deve a mudanças na atividade enzimática da colagenase e sim a uma síntese reduzida desta metaloprotease.

1.5 CITOESQUELETO

Os filamentos citoplasmáticos formam um sistema arquitetônico ou de apoio que proporciona suporte mecânico à célula, além de participar na movimentação celular e no transporte de complexos protéicos e de organelas. O fibroblasto apresenta citoesqueleto composto por filamentos intermediários, microtúbulos e actina, os quais se ligam entre si e a outros componentes celulares por intermédio de moléculas acessórias (KESSLER et al., 2001; ALBERTS, 2004).

Os filamentos intermediários proporcionam força mecânica e resistência à célula, sendo constituídos por polipeptídeos individuais que se caracterizam como moléculas alongadas com um domínio central estendido de α hélice, formando uma estrutura em espiral paralela com outro monômero. Um par de dímeros paralelos associa-se então, de forma antiparalela, produzindo um arranjo em tetrâmero. Os tetrâmeros, por sua vez, são empacotados entre si lateralmente, formando um filamento que inclui 8 protofilamentos paralelos. Cada filamento intermediário individual apresenta, consequentemente, uma seção transversal de 32 α hélices enroladas. O conjunto de polipeptídeos é mantido por fortes interações hidrofóbicas laterais, conferindo importante resistência ao filamento intermediário. A vimentina é um tipo de filamento intermediário, organizada na forma de trama, encontrada em muitas células de origem mesenquimal, como os fibroblastos. (PENA et al., 1983; MANETTI et al., 1987; ALBERTS, 2004).

Os microtúbulos determinam a posição das organelas delimitadas por membranas e direcionam o transporte intracelular. São filamentos cilíndricos, rígidos, longos e ocos formados pela proteína tubulina. Caracterizam-se como heterodímeros formados de duas proteínas globulares denominadas α e β-tubulinas,

fortemente conectadas entre si por ligações não-covalentes. Um microtúbulo é constituído por 13 protofilamentos paralelos, cada um deles composto de moléculas de α e β-tubulinas, alternadamente. Caracteristicamente, apresentam uma das extremidades que se relaciona a um centro organizador de microtúbulos, chamado centrossomo, rico em y-tubulina, Os microtúbulos partem do centrossomo radialmente sob uma conformação em estrela, funcionando como um sistema coordenador para posicionar uma série de organelas no interior da célula (NOVÁKOVÁ et al., 1996; EVANGELIO et al., 1998; ALBERTS, 2004).

A actina determina a forma da superfície celular, sendo necessária para a locomoção da célula como um todo. A actina caracteriza-se como a proteína mais abundante do citoesqueleto, constituindo 5% ou mais do total de proteínas celulares. Os filamentos de actina são polímeros helicoidais formados por 2 cadeias de actina globular ou actina-G, uniformemente orientadas, e organizados em feixes lineares paralelos. Apesar de dispersos por toda a célula, encontram-se em maior concentração no córtex, logo abaixo da membrana celular. Pelo menos 6 tipos de actina estão presentes nos tecidos dos mamíferos, divididos em 3 classes com base nos seus pontos isoelétricos. As α-actinas são normalmente encontradas nas células musculares lisas e as β e y-actinas nas células não-musculares. Os filamentos de actina são mais finos (5 a 9 nm), mais flexíveis e, geralmente, mais curtos que os demais filamentos. A montagem e o desmonte dos filamentos de actina estão relacionados à concentração citosólica dos íons inorgânicos, dentre eles o cálcio (VOLBERG et al., 1986; GOLDSTEIN et al., 1992; DOONG et al., 1996; ALBERTS, 2004; HIRATA et al., 2007).

Os contatos focais são junções altamente especializadas formadas por proteínas de adesão transmembrana e por proteínas de ancoramento intracelular.

Dentre as proteínas de ancoramento, as integrinas caracterizam-se como proteínas de adesão transmembrana, que ancoram a célula às moléculas da matriz extracelular, enquanto que, as caderinas ancoram a célula à membrana plasmática das células adjacentes. A união intracelular aos filamentos do citoesqueleto é feita através das proteínas de ancoramento intracelular como a talina, a α-actinina, a filamina e a vinculina. As fibras de estresse, que constituem feixes de filamentos de actina, acabam na membrana plasmática, onde estão localizados os *clusters* de proteínas transmembranas de adesão. Além de servirem como âncoras para as células, os contatos focais podem também transmitir sinais da matriz extracelular para o interior da célula (BAYLEY et al., 1982; MERCIER et al., 1996; ALBERTS, 2004; WANG et al., 2006).

1.6 CÁLCIO CITOSÓLICO

O cálcio atua como um importante mensageiro intracelular em muitas células, incluindo os fibroblastos, ocupando um papel central no complexo processo da cicatrização. A concentração do cálcio citosólico livre encontra-se em torno de 10^{-7} M, enquanto que, sua concentração é alta no líquido extracelular (10^{-3} M) e no lúmen do retículo endoplasmático, existindo assim, um gradiente através da membrana plasmática e da membrana do retículo endoplasmático tendendo a conduzir o íon para o citosol. Quando um sinal abre temporariamente os canais de cálcio em ambas as membranas, o íon entra no citosol aumentando sua concentração local e estimulando uma série de proteínas celulares que respondem a ele (ARORA et al., 1994; DOONG et al., 1996; BURCHIEL et al., 2000; CHO et al., 2002; PORTER et al., 2002).

Uma vez no interior da célula, o cálcio liga-se a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina. A calmodulina é composta por uma única cadeia polipeptídica e apresenta quatro sítios de alta afinidade ligadores de cálcio. O complexo cálcio-calmodulina, por si só, não possui atividade enzimática, daí atuar através da ligação a outras proteínas (KANG et al., 1997).

Ao estimular as fosfolipases A_2, o complexo cálcio-calmodulina facilita a liberação de ácido aracdônico a partir de fosfolípedes da membrana citoplasmática, que consistem em precursores das prostaglandinas e leucotrienos, além de inibir a oxidação das primeiras. As prostaglandinas e os leucotrienos são os dois maiores contribuidores da resposta inflamatória. O aumento das prostaglandinas estimula a proliferação e migração dos fibroblastos na ferida em cicatrização, além de exercer influência sobre o fluxo sanguíneo local e sobre a agregação plaquetária. O complexo cálcio-calmodulina também exerce influência sobre as plaquetas ao estimular a tromboxane sintetase a produzir tromboxane. Os leucotrienos atuam atraindo leucócitos e promovendo um aumento na permeabilidade vascular local (ARORA et al., 1994; KANG et al., 1997).

Estimulada pelo complexo cálcio-calmodulina, a fosfolipase C catalisa o PIP3 (trifosfato de fosfatidil inositol) em IP3 (trifosfato de inositol) e DAG (diacilglicerol). O IP3 promove o aumento do cálcio citosólico a partir da liberação do retículo endoplasmático e através do influxo de cálcio extracelular, via canais de cálcio. O DAG estimula a proteíno-quinase C, que por sua vez, ativa outras proteínas necessárias à proliferação celular. Fibroblastos tratados com inibidores de proteíno-quinase C ou deficientes em proteíno-quinase C não são estimulados a proliferar (ARORA et al., 1994; KANG et al., 1997; PORTER et al., 2002).

O fator de crescimento derivado de plaquetas estimula a expressão do gene 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A redutase nos fibroblastos dérmicos humanos, que promove, provavelmente, a partir de um aumento na formação do IP3, a ativação da proteíno-quinase C e, consequentemente, um aumento na concentração do cálcio intracelular (ARORA et al., 1994; KANG et al., 1997; PORTER et al., 2002).

No citoesqueleto de actina, os rearranjos estruturais globais em resposta a sinais externos são provocados por uma série de diferentes receptores da superfície celular. Formada por 3 subunidades α, β e y, a proteína G, no seu estado inativo, apresenta GDP (difosfato de guanosina) ligada a subunidade α. Quando estimulada, a subunidade α libera seu GDP, permitindo que o GTP (5`-trifosfato de guanosina) se ligue no seu lugar. Após o estímulo, a subunidade α atua como uma GTPase, hidrolisando o GTP a ela ligado, convertendo novamente a proteína G ao seu estado inativo. As proteínas G não atuam exclusivamente na regulação da atividade das enzimas de membrana que alteram a concentração de AMPc e, consequentemente, do cálcio citosólico, existem proteínas G com unidades α capazes de ativar proteínas que convertem GTPases monoméricas da família Rho, alterando os filamentos de actina do citoesqueleto (DOONG, et al., 1996; KANG et al., 1997).

1.7 CANAIS DE CÁLCIO

As bombas de cálcio são especialmente importantes na manutenção da homeostase do cálcio. As células eucarióticas possuem em suas membranas plasmáticas bombas de cálcio que usam energia da hidrólise do ATP para transportar íons cálcio para fora da célula. Duas outras bombas atuam de maneira importante na manutenção da concentração citosólica do cálcio, uma na membrana

do retículo endoplasmático e outra na membrana mitocondrial interna, seqüestrando cálcio do citosol para o interior das referidas organelas (LÄUGER, 1987; SCHATZMANN, 1989; BERRIDGE et al.; 2003).

O transporte do cálcio pela membrana citoplasmática e as oscilações de sua concentração intracelular são também mediadas pelos canais de cálcio. Estímulos específicos são capazes de ativar esses canais e, consequentemente, provocar uma série de reações celulares. Três tipos de canais de cálcio podem mediar essas reações: os canais de liberação de cálcio ativados por IP3, que permitem a saída de cálcio do retículo endoplasmático, quando a via de sinalização do fosfolipídio de inositol estiver ativada; os receptores de rioidina, que têm esse nome por serem sensíveis a rioidina, reagindo às alterações no potencial de membrana e liberando cálcio do retículo sarcoplasmático, e os canais de cálcio dependentes de voltagem, localizados na membrana plasmática e que se abrem em resposta à despolarização (BERRIDGE, 1993; MARKS, 1997; LACINOVÁ, 2005).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem fazem parte de uma família de proteínas de alto peso molecular (TSIEN et al, 1991; JONE, 1998). De acordo com suas condutâncias e sensibilidades à voltagem, podem ser classificados em:

- Tipo-L – são canais de grande condutância, com correntes de longa duração.
- Tipo-N – são canais de cálcio neuronais
- Tipo-P/Q – são canais de cálcio sensíveis à toxina ω-conotoxina (*Conus geographus*)
- Tipo-R – são canais de cálcio resistentes à toxina ω-conotoxina

- Tipo-T – apresentam pequena condutância e corrente transitória.

A análise da seqüência de proteínas dos canais de cálcio indica a existência de 4 domínios transmembrana (I – IV), sendo que, cada domínio é composto por 6 segmentos homólogos (S1 – S6). As regiões N e C terminais estão localizadas no lado citoplasmático da membrana plasmática. O segmento transmembrana S4 contém de 3 a 5 resíduos de aminoácidos carregados positivamente, caracterizando-se, presumivelmente, como o sensor de voltagem do canal (ABERNETHY et al., 2002).

A diversidade molecular dos canais de cálcio tem sido sistematicamente estudada. Soldatov et al., em 1992, ao analisarem a seqüência de nucleotídeos dos canais de cálcio de fibroblastos humanos, notou que a mesma apresentava transcrições similares aos canais de cálcio tipo-L cardíacos, canais estes, sensíveis ao verapamil.

Cho et al., em 2002, aplicaram estímulos elétricos para ativar canais iônicos na membrana plasmática de fibroblastos humanos em cultura. Ao utilizar correntes contínuas de 1 a 10 Hz, 2 v/cm, por 30 minutos, notou a ocorrência de um aumento na concentração do cálcio citosólico, sem afetar a viabilidade celular.

1.8 BLOQUEADORES DO CANAL DE CÁLCIO (VERAPAMIL)

Fleckenstein, em 1967, relatou que o verapamil, uma vasodilatador coronariano, apresentava efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos, resultantes da redução do movimento do cálcio para o interior dos miócitos cardíacos.

O verapamil, um derivado sintético da papaverina, é um bloqueador do canal de cálcio que atua especificamente nos canais dependentes de voltagem do tipo-L. Para que ele possa efetuar sua ação bloqueadora, o verapamil necessita fixar-se a porção do canal localizada na face interna da membrana citoplasmática e por isso, necessita entrar na célula para exercer seu efeito. O verapamil atua sobre os nódulos sinusal e átrio-ventricular, sendo utilizado no tratamento das taquicardias supraventriculares. Atua ainda na resistência vascular coronariana aumentando o fluxo sanguíneo através destes vasos. Administrado por via endovenosa, sua dose habitual é de 5 a 10 mg, seu efeito máximo ocorre 15 minutos após sua aplicação, sendo sua meia vida de 1,5 a 5 horas (FLECKENSTEIN, 1983; TRIGGLE, 1990; GILMAN et al., 1996; PRISANT, 2001).

Diegelmann et al., em 1972, incubaram fibroblastos com a citocalasina B, drogas capazes de induzir a ruptura dos microfilamentos, promovendo o arredondamento das células e a inibição da síntese e da secreção de colágeno. Aggeler et al., em 1984, demonstraram que a citocalasina B era capaz de induzir fibroblastos sinoviais de coelhos e cultura a assumir uma morfologia mais esférica, diminuindo a síntese de colágeno e aumentando a secreção de colagenase. Ehrlich et al., em 1974, usaram um agente antimicrotubular, a colchicina, para promover o arredondamento de fibroblastos *in vitro*, bloqueando o movimento de vesículas a partir do complexo de Golgi e, conseqüentemente, a síntese de colágeno.

Um grande número de estudos tem demonstrado que os bloqueadores do canal de cálcio são capazes de inibir a ativação plaquetária. Bonadonna, em 1986, descreveu que o verapamil, ao inibir a atividade da proteíno-quinase C, reduz a capacidade das plaquetas de se agregarem. Glusa, em 1988, demonstrou que o verapamil altera a agregação plaquetária ao inibir a liberação de serotonina. Yamada

et al., em 1990, relataram que os bloqueadores do canal de cálcio exercem efeito inibitório sobre a síntese de tromboxane A_2, um importante fator na ativação das plaquetas.

Block et al., 1989, discutiram a influência dos bloqueadores do canal de cálcio sobre a inibição da proliferação celular de fibroblastos em cultura, por influência da inibição da proteíno-quinase C. Rayan et al., 1996, demonstraram *in vitro*, que o verapamil foi capaz de inibir a contração de fibroblastos acometidos pela doença de Dupuytren. Hoffman et al., 1999, demonstraram o potencial do verapamil como modulador farmacológico na migração e proliferação de células epiteliais pigmentares da retina humana cultivadas em gel de colágeno. Além destes, outros autores têm demonstrado que praticamente qualquer agente ou condição que cause uma alteração na forma do fibroblasto, tornando-o mais esférico, pode causar um aumento na secreção de colagenase e uma inibição na síntese de colágeno.

2 OBJETIVOS

A proposta do presente trabalho foi estudar os efeitos do verapamil sobre fibroblastos dérmicos humanos em cultura. Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Determinação da concentração ideal de verapamil que produza efeitos sem alterar a viabilidade de celular.

2. Análise das alterações morfológicas sofridas pelos fibroblastos após incubação com o verapamil.

3. Determinação das alterações no padrão organizacional do citoesqueleto dos fibroblastos tratados.

4. Determinação da influência do verapamil sobre a homeostase do cálcio.

5. Análise da influência do verapamil sobre a síntese de MMP-I.

6. Análise da influência do verapamil sobre a síntese de procolágeno, bem como do colágeno I.

7. Determinação da influência do verapamil sobre a contração do gel de colágeno povoado por fibroblastos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS

As culturas foram realizadas a partir de amostras de pele humana derivadas de descartes cirúrgicos de mamoplastias redutoras. O material foi submetido à dissociação mecânica, sendo então, os diminutos fragmentos (1 mm^2) transferidos para garrafas de cultura (25 cm^2) contendo 2 mL de meio DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Médium - Sigma, St. Louis, MO), com 10% SFB (soro fetal bovino – Cultlab, SP, Brasil) e antibióticos (estreptomicina 100 μg/mL / penicilina 100 UI/mL). No dia seguinte, o meio de cultura foi completado para 5 mL. O material foi mantido em estufa a 37 ^oC, em uma atmosfera de 5% de CO_2, sendo o meio de cultura trocado a cada 72 horas, até se formar uma monocamada confluente. Ao atingirem a confluência, as culturas foram submetidas à dissociação enzimática com tripsina 0,05% + EDTA 0,02% (Ethylenediaminetetraacetic Acid). Estoques de células foram congelados na presença de 10% de crioprotetor (Dimetilsulfóxido – DMSO). Todos os experimentos foram realizados entre a terceira e a quinta amplificação (CARREL et al., 1911; SONOHARA et al., 1981).

3.2 TRATAMENTO COM A DROGA

Após serem submetidos à dissociação enzimática, os fibroblastos (inóculo inicial $2x10^4$) foram plaqueados em placas de Petri (35 mm) com lamínula, onde cresceram por 48 horas, determinando dois grupos de estudos, controle e tratado. O grupo controle foi mantido em 1 mL de DMEM e o grupo tratado incubado com DMEM com diferentes concentrações de verapamil (10, 50 e 100 μM), por 1, 2, 6,

12, 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, no estudo da viabilidade celular, um terceiro grupo chamado recuperado foi criado. Os fibroblastos deste grupo permaneceram em DMEM com verapamil por 48 horas e em DMEM por outras 48 horas.

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO

Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços (inóculo inicial $2x10^4$), contendo 1 mL de DMEM sem e com a adição de 50 μM de verapamil. Após 24, 48, 72 e 96 horas as culturas foram tripsinizadas e o número de células contado em câmara hemocitométrica (STANLEY et al., 1997; RIZZO et al., 1998). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados foram expressos como media±erro de média.

3.4 INCORPORAÇÃO DE BROMODESOXIURIDINA (BrdU)

As células foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro a uma densidade de $2x10^4$ células e, após 48 horas, a BrdU [180μg/mL] foi incorporada por 1 hora. Após esse período, as células foram lavadas em PBSA e fixadas em metanol gelado por 30 minutos. Seguiu-se, então, uma série de lavagens em PBSA (3 x 5 minutos). As preparações citológicas foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma), por 10 minutos. Nova série de lavagens em PBSA foi realizada. Na seqüência, o anticorpo primário anti-BrdU + nuclease (Amersham Pharmacia Biotech, England) (1:100) foi incubado por 1 hora e meia em câmera úmida e escura. Após esse período, seguiu-se nova série de lavagens em PBSA e, em seguida, o anticorpo secundário anti-mouse + FITIC, (Sigma) (1:100) foi incubado

por 1 hora. Após nova série de lavagens, as células foram tratadas com Rnase (Usb Corporation, Cleveland, USA) [10 mg/mL], por 10 minutos e lavadas em PBSA. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com solução de *anti-fading* (Vecta-Shield, Vector-Lab, CA) e iodeto de propídio (Sigma) [10 μg/mL]. Para determinar o índice de incorporação de BrdU, em cada preparação citológica, foi considerado o número de células marcadas em 1000 células (DOLBEARE et al., 1985; OKU et al., 1987; VAN FURTH et al., 1988). A contagem foi realizada em microscópio de fluorescência (Nikon). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados foram expressos como media±erro de média.

3.5 TESTE DE VIABILIDADE POR AZUL DE TRYPAN

O teste de viabilidade celular foi realizado simultaneamente ao de proliferação celular. As células foram plaqueadas em placas com 24 poços (2 x 10^4 células por poço) e tratadas com 50 μM verapamil em DMEM e, como controle, foram utilizadas células em DMEM. Após 48h de incubação, o meio foi retirado. Cada poço foi lavado com PBSA e foram adicionados 0,5 mL de tripsina para que as células se soltassem do substrato. Quando todas as células já estavam em suspensão, a tripsina foi neutralizada adicionando-se 0,5 mL de DMEM. Toda a suspensão (1 mL) foi transferida para tubos de Eppendorf e foram adicionados 2 μL de azul de trypan (0,4% diluído em PBSA) em cada amostra. As células totais e coradas foram contadas em câmara de Neubauer. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados foram expressos como media±erro de média.

3.6 TESTE DE VIABILIDADE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células controles e tratadas, após 48 horas de incubação, foram lavadas e fixadas com 3,7% de formol, por 30 minutos. Após novas lavagens com PBSA, as células foram incubadas com 20 μL DAPI (1:200) (4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e com 10 μL iodeto de propídio, em câmara úmida e escura, por 1 hora. A análise e contagem das células foram realizadas ao microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Oberkochen, Germany). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados foram expressos como media±erro de média.

3.7 ANÁLISE DO CITOESQUELETO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Fibroblastos fixados em formol a 3,7%, por 30 minutos, e permeabilizados com Triton X-100 a 0,5%, por 10 minutos, foram incubados a temperatura ambiente, em câmara úmida e escura, com anticorpos primários específicos para elementos do citoesqueleto (anti-vimentina e anti-α-tubulina) (1:100 e 1:200) (Sigma), por no mínimo 3 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBSA e incubadas com anticorpos secundários *anti-mouse* conjugados aos fluocromos FITC ou TRITC (Sigma) (1:100), por 1 hora. A actina foi corada com faloidina conjugada com FITC ou TRITC (Sigma), por 15 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas Rnase [10 mg/mL], por 20 minutos. Após essa etapa, os núcleos foram corados com iodeto de propídio, por 15 minutos. As lamínulas foram posteriormente montadas em lâminas com *anti-fading* (MANELLI-OLIVEIRA et al., 2001). Em algumas preparações foram realizadas marcações triplas: o anticorpo anti-tubulina

foi revelado com anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado ao Cy5 (1:100) (Invitrogen), os filamentos de actina foram corados por faloidina conjugada à fluoresceína-FITC (1:80), por 20 minutos, e os núcleos foram corados por iodeto de propídio [10 µg/mL], Após montagem das lâminas com *anti-fading,* foi realizada a análise ao microscópio confocal de varredura a laser.

3.8 ANÁLISE DOS CONTATOS FOCAIS

Após 48 horas de incubação, fibroblastos controles e tratados foram fixados em formol e permeabilizados com Triton X-100. Posteriormente, as células foram incubadas Rnase [10 mg/mL], por 20 minutos. Após esse período, as células foram lavadas com PBSA e incubadas com anticorpos primários anti-vinculina (Sigma) (1:50), por no mínimo 3 horas. Os filamentos de actina foram corados por faloidina-TRITC (1:80), por 20 minutos. Após serem lavadas com PBSA, as células foram incubadas com anticorpos secundários *anti-mouse* conjugados ao FITC (Sigma) (1:100), por 1 hora. Os núcleos foram corados com ToPro 3 (Invitrogen) e as lamínulas foram posteriormente montadas em lâminas com *anti-fading*. A análise foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser.

3.9 MARCAÇÃO DO NÚCLEO E MEMBRANA PLASMÁTICA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células controle e tratada, após período de incubação, foram lavadas com PBSA e incubadas, para marcação do núcleo, com DAPI (4´, 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) 100 ng/mL, por 30 minutos, e, para marcação da

membrana, com 10 µg/mL de lipoproteína de baixa-densidade (DilC18) (Invitrogen). As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal de varredura a laser.

3.10 DETECÇÃO E ANÁLISE DO CÁLCIO INTRACELULAR

Os fibroblastos dos grupos controle e tratado, após lavagens com PBSA, foram incubados com *calcium green* (Invitrogen) 0,5 µ/mL em DMEM, por 30 minutos, a 37 ^{o}C. Essas sondas, em presença de íons cálcio tornam-se fluorescentes, sendo excitáveis a 488 e emitindo a 526nm. A análise, ao microscópio confocal, foi feita na configuração de fluoresceina utilizando-se módulo especifico do software [33]. A dinâmica do cálcio citosólico foi caracterizada por imagens seqüenciais da fluorescência do *calcium green*, obtidas ao microscópio confocal, a cada 5 minutos, durante 1 hora. Um perfil da fluorescência do *calcium green* de fibroblastos controle e tratado com 50 µM de verapamil foi obtido usando-se os softwares *profile*, *histogram analysis* e *pseudo-3D* LSM510.

3.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA COLAGENASE

A determinação da atividade da colagenase (MMP-1) foi realizada a partir da análise do meio condicionado de cultura de fibroblastos controles e tratados com 50 µM de verapamil. O kit utilizado para análise foi o ECM 710 (Chemicon, Temecula, CA, USA), o qual utiliza colágeno I como substrato. Uma vez clivado o colágeno libera fragmentos, cuja concentração foi determinada por reação enzimática com a estreptavidina. A adição da enzima ao substrato resulta em um produto colorido, cuja absorbância está em 450 nm.

3.12 ZIMOGRAFIA DE CASEÍNA

Os meios condicionados de fibroblastos tratados ou não com verapamil foram estudados por zimografia. Após plaqueadas (2 x 10^4), as células foram cultivadas em DMEM com SFB 10% e 50 µM de verapamil, por 30 horas. Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBSA, sendo então, mantidas em meio livre de SFB, porém, com verapamil, por mais 18 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle, sendo submetidas às mesmas condições de privação de SFB.

Após coletado, foi adicionado ao meio condicionado, inibidor de protease (Sigma). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi concentrado em 20x e dialisado em PBSA (Microcom 30.000D Millipore Inc Bedford, MA). Depois de normalizadas em relação ao número de células presentes em cada grupo, as amostras foram carregadas em gel de caseína 12% (Novex®, Invitrogen). Foram carregadas também os padrões de pesos moleculares e de MMPs (Chemicon). Após eletroforese, o gel foi lavado com 2.5% Triton X-100, por 30 minutos, equilibrado em 10 mM Tris (pH 8.0), para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida foi incubado a 37 °C em solução tampão reveladora contendo 50 mM Tris (pH 8.0), 5 mM $CaCl_2$ e 0.02% NaN_3, por 24 horas. Depois de corado com 0.2% Comassie Blue (Amersham Co Arlington Heights IL, USA), “overnight”, e descorado com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada, o gel revelou as metaloproteinases ativas, que foram identificadas como bandas claras de lise em fundo azul.

Nas amostras controle e tratadas, as bandas de degradação enzimática obtidas na zimografia foram comparadas por densitometria de gel, utilizando-se o

programa de domínio público *Image J*, criado por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, NIH, USA. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados densitométricos foram expressos como media±erro de média.

3.13 "IMMUNOBLOT"

Grupos tratados e controles foram submetidos a meio privado de SFB para análise por *immunoblot*. As células foram lisadas em tampão RIPA (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) com inibidores de proteases. Após coletado, o meio condicionado foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4 ^{o}C. As proteínas foram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA) e concentradas através de precipitação por etanol. Em seguida, foram ressuspendidas em tampão contendo 62,5 mM Tris pH 6.8, 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% glycerol, 5% mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol. A eletroforese dos fibroblastos lisados e do meio condicionado foi realizada seguindo o método SDS-PAGE. Cada poço foi carregado com iguais quantidades (20 µg) de proteínas, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (1.5 M Tris-HCL, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amershan). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite, 0,05% de Tween-20 em TBS (TTBS). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-MMP-1 (policlonal de coelho, Chemicon). Os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados HRP. O protocolo de quimioluminescência (ECL

kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação em filme radiográfico. As membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Pierce Biotechnology) e submetidas a novas análises com anticorpos. O controle interno de β-actina foi utilizado como comparação.

3.14 ANÁLISE DO COLÁGENO E PROCOLÁGENO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Fibroblastos controles e tratados foram cultivados sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, em densidade inicial de 2 x 10^4 células por placa, por 48 horas. Posteriormente as células foram lavadas com PBSA e submetidas à fixação com formaldeído 3,7%. As células utilizadas na análise do procolágeno I foram permeabilizadas com Triton X-100, por 10 minutos. As células foram então incubadas com os anticorpos primário anti-colágenos I (1:50) e anti-procolágenos I (1:50) (Sigma), por 1 hora, em câmara úmida e escura, seguido pelos anticorpos secundários (anti-rabbit-FTIC) (1:100) e (anti-rat Alexa488) (1:250) (Sigma), por mais 1 hora, nas mesmas condições ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com Rnase [10 mg/mL], por 20 minutos, e com iodeto de propídio [10 μg/mL], por 10 minutos. A seguir, as lamínulas foram montadas em lâminas com solução de *anti-fading*. A análise foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser.

3.15 "IMMUNOBLOT" DO COLÁGENO

Seguindo a mesma metodologia utilizada na análise da colagenase (2.13) fibroblastos controles e tratados foram lisados e submetidos à *immunoblot*. As membranas de nitrocelulose, após sucessivas lavagens, foram incubadas com anticorpos anti-colágeno I (Sigma) "overnight". Os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados HRP. O controle interno de β-actina foi utilizado como comparação.

3.16 INCLUSÃO DOS FIBROBLASTOS E POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO

Em condições apropriadas, fibroblastos dérmicos humanos cresceram em garrafas de cultura de 75 cm^2, até atingirem a subconfluência, sendo, posteriormente, submetidos à dissociação enzimática por tripsina. Após contagem do número de células em hemocitômetro, a suspensão foi centrifugada, sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* resultante da centrifugação ressuspendido em PBS (1X), no volume de 400 μL / 400.000 células. Em placas com 24 poços (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) os 400.000 fibroblastos / 400 μl PBSA 1x, foram incubados com 100 μl PBSA 10x, 100 μl NaOH 0,1M e 400 μl solução de colágeno tipo I, por poço. As placas foram mantidas em estufa a 37 ^oC, em atmosfera de 5% de CO_2, aguardando-se a formação da matriz por 12 horas. Uma vez polimerizado o gel, 1 mL de DMEM, com 10% de SFB, foi adicionado ao grupo controle e, o mesmo volume de meio, acrescido de 50 μM de verapamil, foi adicionado ao grupo tratado. O gel foi gentilmente solto das bordas do poço, sendo então, mantido em estufa com 5% CO_2, a 37 ^oC, por 48 horas (BELL et al., 1979). Esta análise foi desenvolvida em

colaboração com a Profa. Dra. Marisa Roma Herson e com o Dr. André Oliveira Paggiaro, no Laboratório de Cirurgia Plástica (LIM-04), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.17 AVALIAÇÃO DOS FIBROBLASTOS POVOADOS EM GEL DE COLÁGENO POR HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Fibroblastos controles e tratados foram incluídos em gel de colágeno conforme descrição anterior (2.15). Posteriormente, os géis foram submetidos a banhos seriados em etanol em concentrações crescentes (50%, 70%, 90%, 96% e 100% - 20 minutos em cada uma das concentrações, tendo passado 2x pelo etanol a 100%). Na seqüência, os géis foram submetidos a uma solução de etanol/xilol (1:1) e a seguir a xilol puro (2x), sendo, posteriormente, incluídos em parafina. Após a realização dos cortes, as amostras foram submetidas novamente ao xilol e, em seguida, a banhos decrescentes de etanol. Após terem sido lavadas em água destilada, as amostras foram submetidas à hematoxilina, por 5 minutos, e à eosina, por 3 minutos. Após novos banhos em álcool, álcool/xilol e xilol diafanizador, foi realizada a montagem das lâminas.

3.18 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTRAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO

O gel de colágeno foi fotografado com uma câmera digital (Sony Cybershot P32, 7,2 Megapixels, Tokyo, Japan) 12, 24, 36 e 48 horas após o experimento ter sido iniciado. A área do gel foi calculada utilizando-se o software de domínio público "UTHSCSA *Image Tool for Windows* versão 3.0" [(37)]. Cada experimento foi realizado

em triplicata e repetido pelo menos por duas vezes. Os dados foram expressos como media±erro de média.

3.19 ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DOS FIBROBLASTOS EM GEL DE COLÁGENO

O gel de colágeno tipo I foi utilizado para estudar a morfologia tridimensional dos fibroblastos e o padrão de organização do citoesqueleto. Após a polimerização do gel, os fibroblastos foram lavados com PBSA e fixados com formaldeído 3,7%, por 30 min. Em seguida, os fibroblastos, após serem novamente lavados com PBSA, foram incubados em câmara úmida e escura, por 1 hora, com 40 µl Rodamina-Faloidina (Sigma, Missouri, USA), 100 µl Triton X-100, 200 µl Rnase (1 mg/mL) e 1 µl Sytox green (5 mM) (Invitrogen). Após essa etapa, o gel foi montado em lâminas com VectaShild e analisado ao microscópio confocal de varredura a laser .

3.20 ANÁLISE AO MICROSCÓPIO CONFOCAL

As imagens foram obtidas através do uso de microscópio confocal de varredura a laser (Carl Zeiss Oberkochen, Germany), com lasers de argônio e hélio-neônio ligados a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100M, usando lente objetiva de imersão com aumento de 63X. A fluorescência emitida foi selecionada por um filtro LP 505nm e exibida com uma resolução de 512X512 pixels, em modo RGB. As imagens de secções verticais foram obtidas por intervalo de seccionamento apropriado no eixo Z entre 0,3 a 0,7 µM. Os *softwares profile*, *histogram analysis, pseudo-3D* e *3D for Zeiss LSM 510* foram utilizados na análise

das imagens. As reconstruções tridimensionais foram obtidas através das projeções das secções verticais.

3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Student's t foi utilizado para avaliação da diferença entre dois grupos. Diferenças entre três ou mais grupos foram avaliadas pelo teste de ANOVA. O software utilizado para a análise foi o Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3.22 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com a resolução n°.196/1996 do Conselho Brasileiro de Saúde, tendo sido aprovado pelo comitê de ética (04/2003, protocolo n.437). O pré-requisito para participação no estudo está baseado no entendimento da proposta do trabalho e na assinatura de consentimento informado.

4 RESULTADOS

4.1 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CURTA DURAÇÃO

Os fibroblastos cresceram em meio DMEM, com 10% SFB e antibióticos, a partir de fragmentos de pele (Figura 1), estabelecendo assim, culturas primárias de curta duração. Ao microscópio invertido de contraste de fase, os fibroblastos apresentaram-se como células alongadas, fusiformes, bipolares, com numerosas expansões citoplasmáticas irregulares.

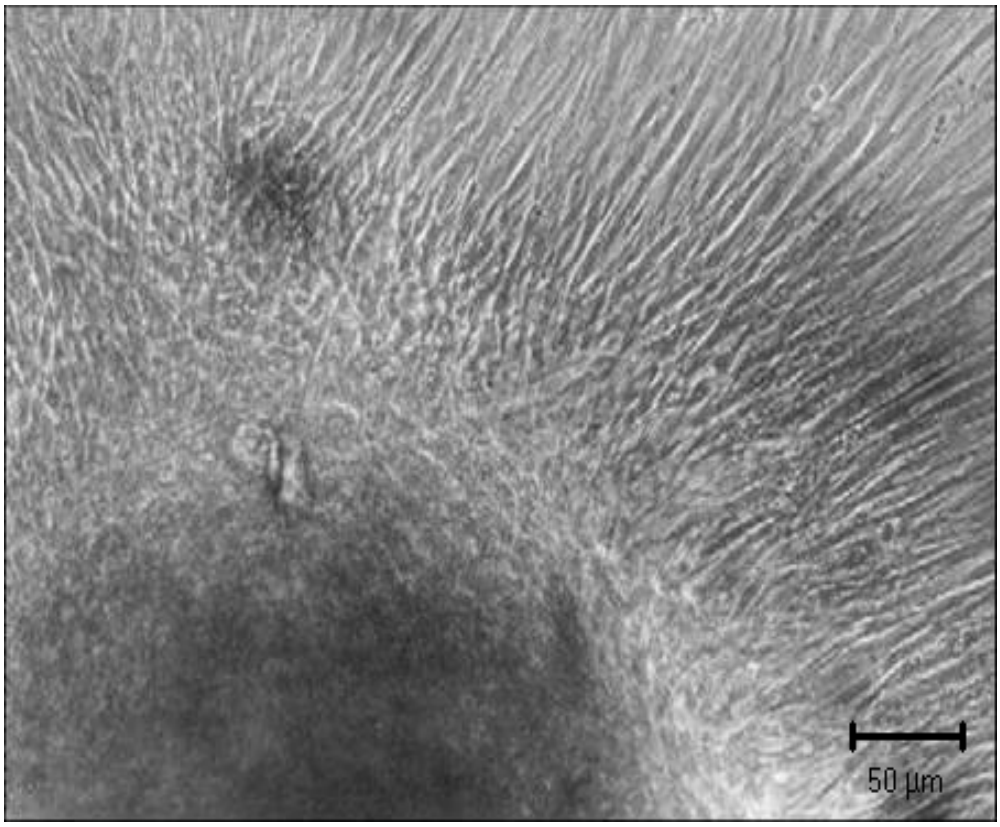

Figura 1 – Fotomicrografia, ao microscópio invertido, de fibroblastos crescidos a partir de fragmento de pele humana aderido à placa de cultura.

4.2 FIBROBLASTOS EM CULTURA TRATADOS COM O VERAPAMIL

Os fibroblastos em cultura foram incubados com 10, 50 e 100 μM de verapamil, por 1, 2, 6, 12, 24 e 48 horas.

As concentrações de 10 μM de verapamil (Figura 2A) não provocaram alterações estruturais ou morfológicas, durante os tempos de estudos. Submetidos à incubação com 100 μM de verapamil (Figura 2B), os fibroblastos apresentaram sinais de citotoxidade, com importante alteração da morfologia celular.

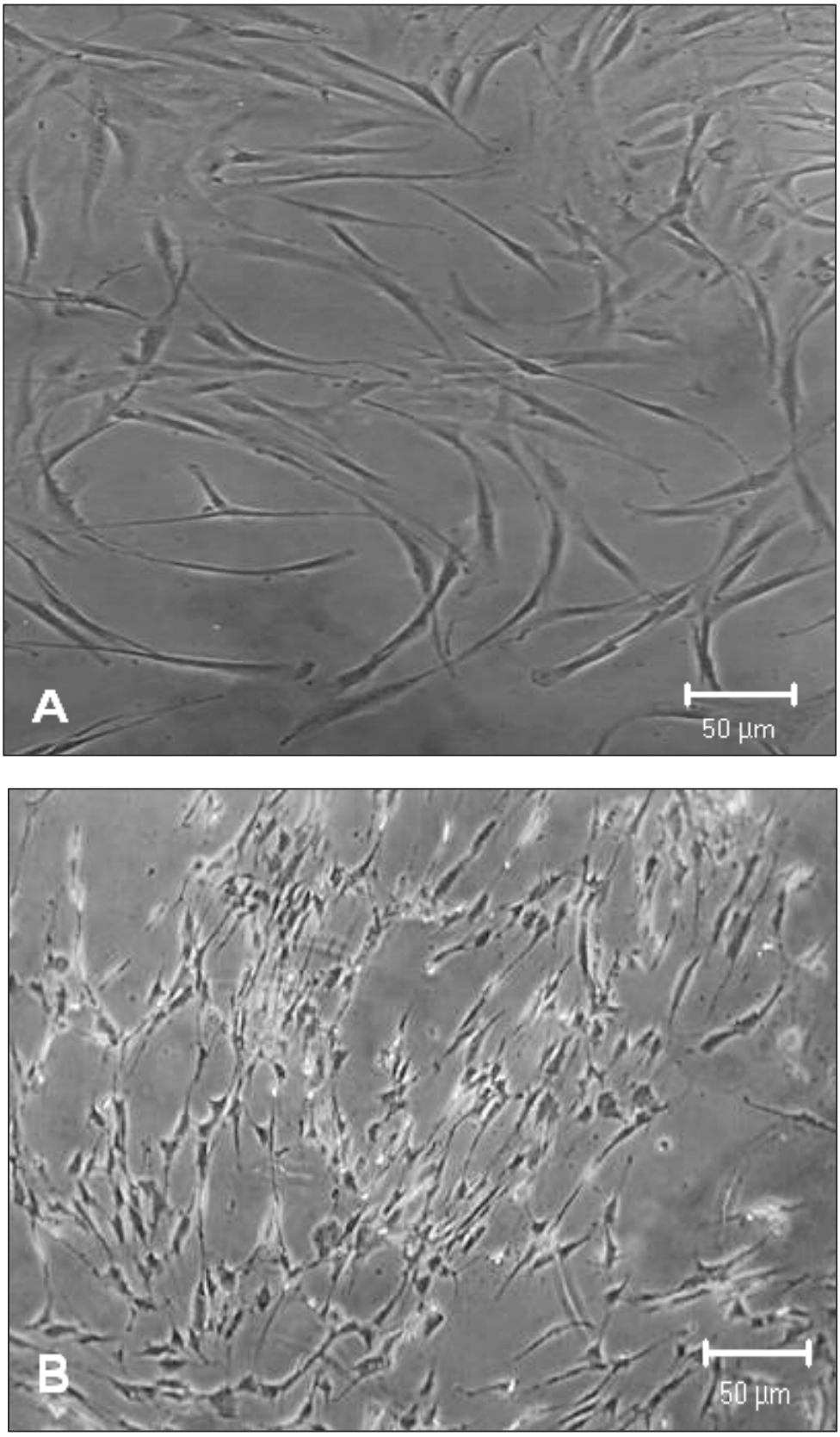

Figura 2 – Imagem ao microscópio invertido de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de fibroblastos submetidos à incubação com 10 µM verapamil (A) e 100 µM verapamil (B).

Ao serem incubados com 50 μM de verapamil por 48 horas, os fibroblastos sofreram alterações no seu padrão morfológico, passando de fusiforme para uma conformação mais arredondada/estrelada. Em cada grupo de 1000 células, foi contado o número de fibroblastos com morfologia alterada, tendo sido observado 63% de fibroblastos arredondados no grupo tratado, com apenas 1% de fibroblastos com tendência a morfologia mais esférica no grupo controle. Foi possível notar ainda, ao microscópio invertido de fase, o aparecimento de numerosos grânulos no interior da célula, distribuídos por todo o citoplasma (Figura 3).

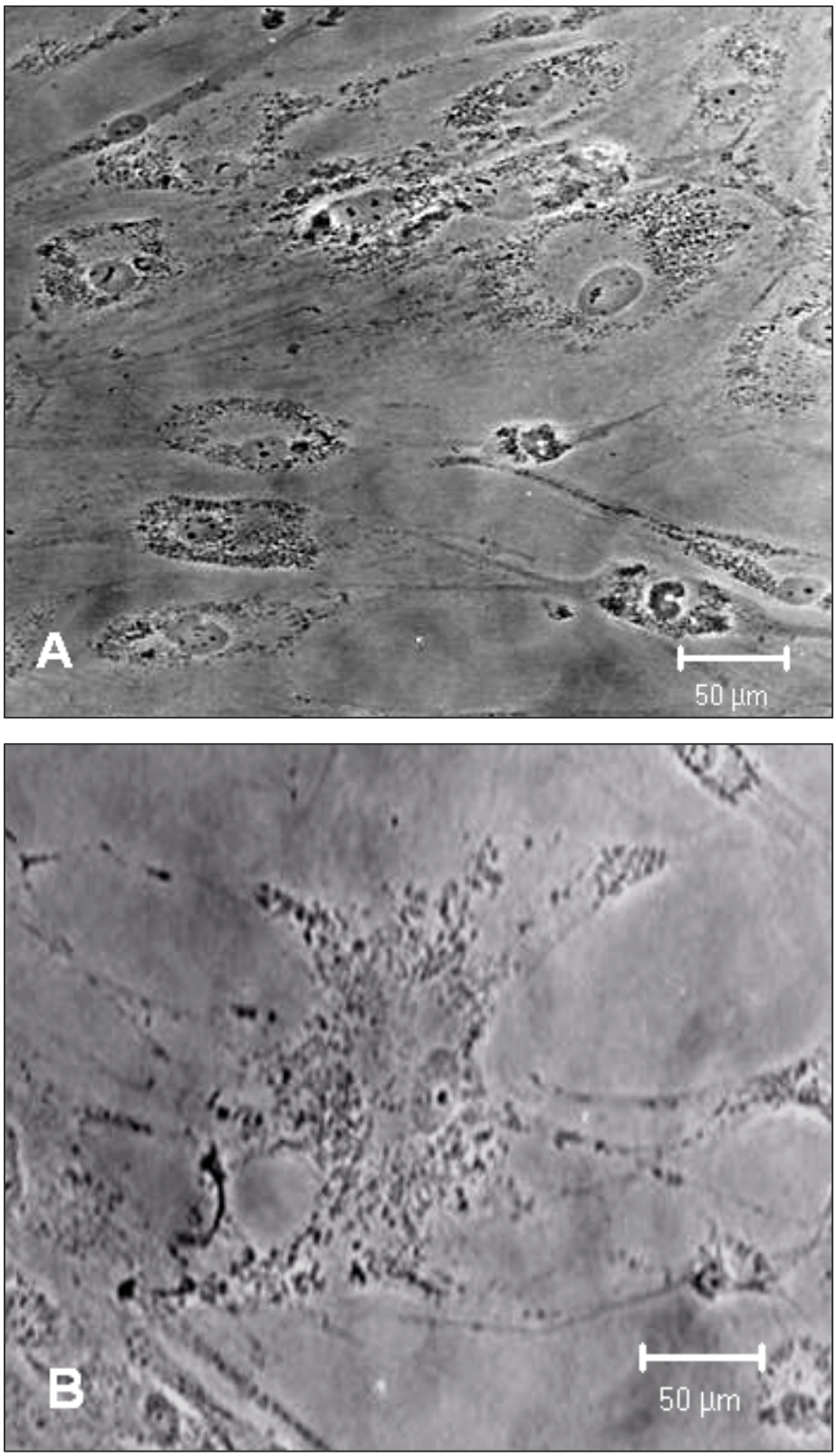

Figura 3 – Imagem ao microscópio invertido de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico de fibroblastos submetidos à incubação com 50 µM verapamil, por 48 horas, em menor (A) e maior aumento (B).

4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.3.1 CURVA DE CRESCIMENTO

A proliferação celular foi avaliada, inicialmente, por curvas de crescimentos. Partindo de um inóculo inicial de 2 x 10^4 células/mL, as culturas controles alcançaram um platô, quando as células atingiram a densidade de saturação de 6,30 x 10^4 células/mL, enquanto que, nas culturas tratadas, o platô foi atingido com a densidade de saturação de 2,40 x 10^4 células/mL (Figura 4). Ao longo de todo o estudo, o número de células controles foi sempre maior em relação às culturas tratadas, sendo que, as maiores diferenças ocorreram entre 48 e 72 horas. Segundo a análise estatística, as diferenças foram significativas em todos os tempos estudados.

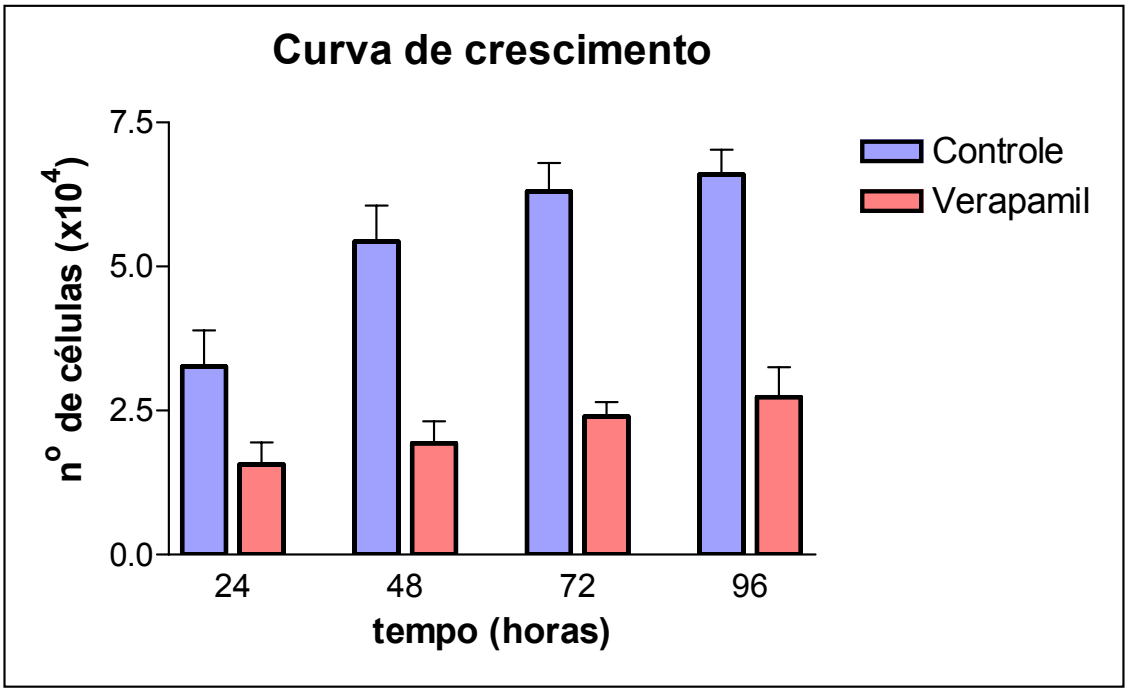

Figura 4 – Curvas de crescimento de fibroblastos controles e tratados com 50 µM de verapamil (Inóculo inicial - 2 x 10^4 células/mL) ($p<0,05$)

Tabela 1 – Número de células/mL nas culturas controles e tratadas com 50 μM de verapamil, nos tempos pré-determinados

Tempo (horas)	Controle	Verapamil 50μM
24h	$3{,}26 \times 10^4$ (3,0 – 3,5)	$1{,}56 \times 10^4$ (1,4 – 1,7)
48h	$5{,}43 \times 10^4$ (5,2 – 5,7)	$1{,}93 \times 10^4$ (1,9 – 2,1)
72h	$6{,}30 \times 10^4$ (6,1 – 6,5)	$2{,}40 \times 10^4$ (2,3 – 2,5)
96h	$6{,}60 \times 10^4$ (6,5 – 6,8)	$2{,}73 \times 10^4$ (2,5 – 2,9)

Inóculo inicial - 2×10^4 células/mL

Sobre esses resultados foi calculado o percentual de inibição da proliferação induzido pelo verapamil 50 μM. As células tratadas com a droga apresentaram percentuais de inibição de 52%, 64,46%, 61,91% e 59,1%, nos tempos T24, T48, T72 e T96, respectivamente (Figura 5). Esses resultados mostram que o pico de inibição ocorreu após 48 horas do início do tratamento, tendo o número de células/mL chegado a valores inferiores ao do inóculo inicial.

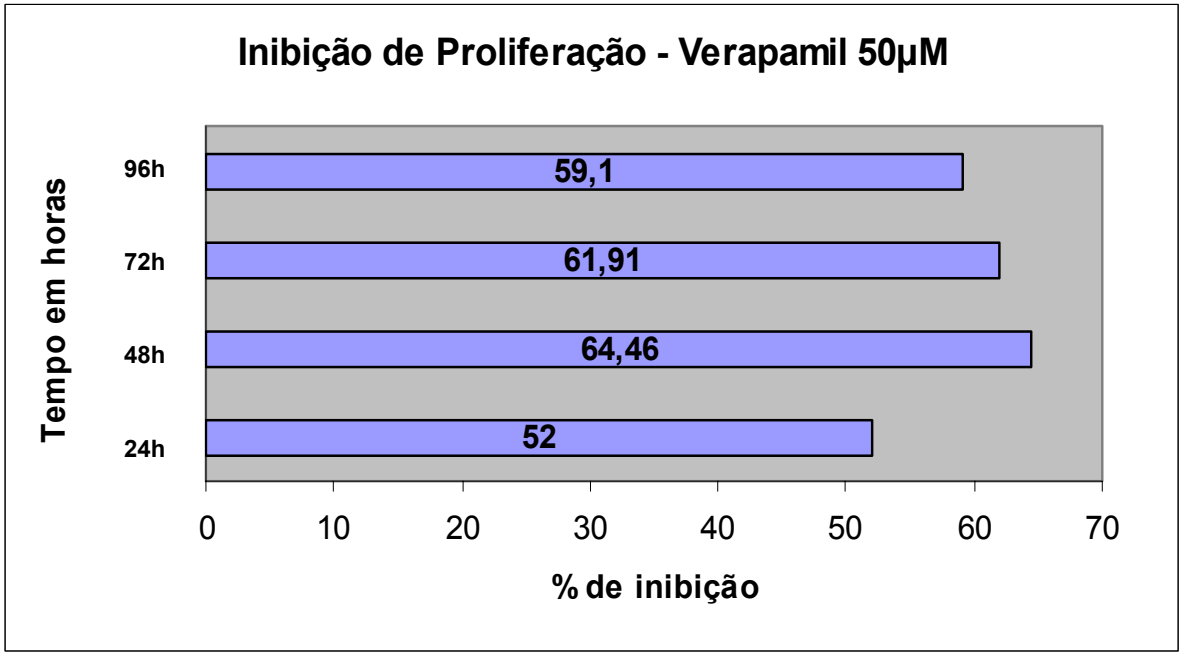

Figura 5 – Efeito do verapamil 50 µM sobre a proliferação de fibroblastos dérmico humanos em cultura

4.3.2 INCORPORAÇÃO DE BrdU

A freqüência de células na fase S do ciclo celular foi avaliada pela incorporação de BrdU, cujo padrão de marcação pode ser observado na figura 6.

As culturas controles apresentaram índices de incorporação de BrdU de 11,43%, enquanto que, as células tratadas com verapamil 50 µM, após 48 horas de incubação com a droga, apresentaram um índice de incorporação de BrdU de 6,92% (Figura 7). Dessa forma, a análise dos dados mostrou que houve uma diferença significativa no número de células na fase S entre os grupos controle e tratados. Para determinação do índice de incorporação de BrdU, em cada preparação citológica e em todos os grupos estudados, foi considerado o número de células marcadas em 1000 células.

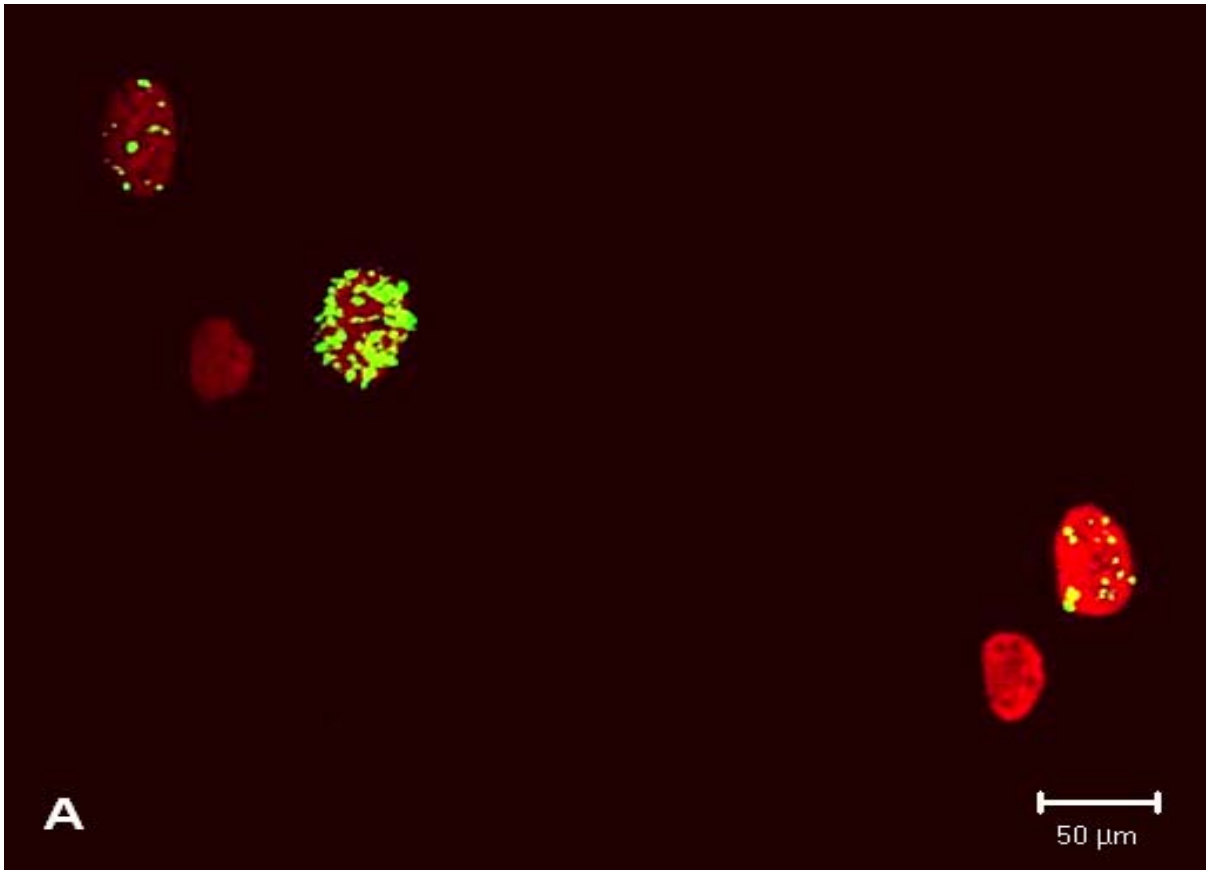

Figura 6 – Imagem obtida ao microscópio confocal de varredura a laser mostrando o padrão de incorporação de BrdU, detectado com anticorpo anti-BrdU-FITC, em fibroblastos controles. Os núcleos foram contra-corados com iodeto de propídio.

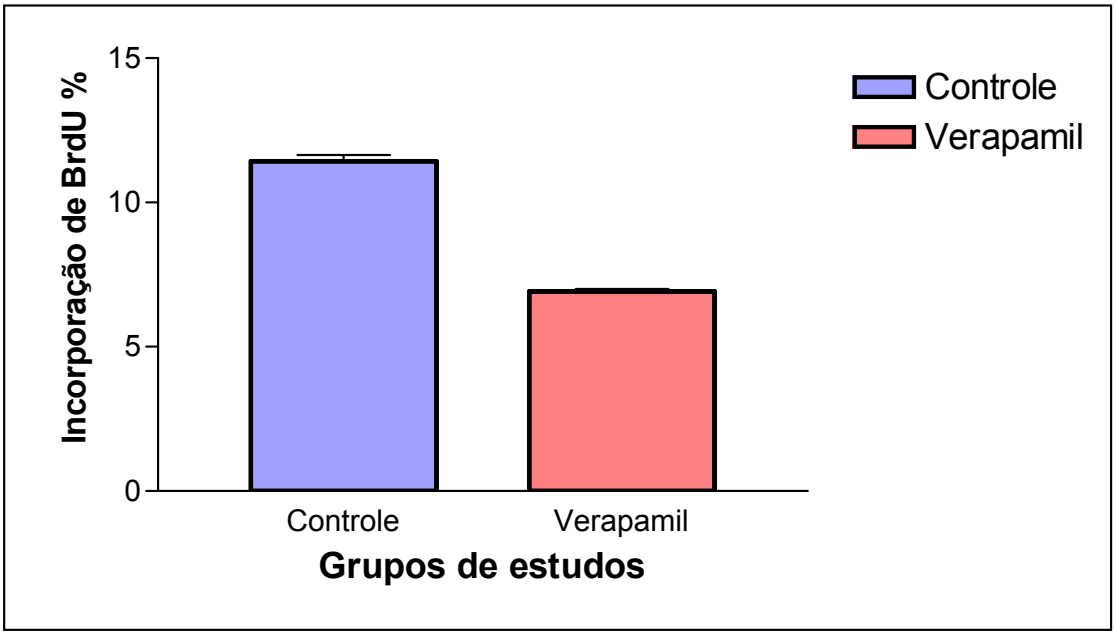

Figura 7 – Índice de células na fase S foi determinado pelo número de fibroblastos que incorporaram BrdU em cada grupo de 1000 células. (p<0,0001)

4.4 VIABILIDADE CELULAR

4.4.1 TESTE DE VIABILIDADE POR AZUL DE TRYPAN

Utilizando-se o método de exclusão de células inviáveis por azul de trypan, foi possível notar que as células controles, bem como as células tratadas com verapamil 50 μM, apresentaram 92,31% e 91,01% de células vivas, respectivamente, excluindo-se assim, possível ação citotóxica da droga. Para melhor analisar a citotoxicidade, um novo grupo de estudo foi criado. Após serem submetidas, por 48 horas, ao tratamento com verapamil 50 μM, as culturas tratadas tiveram seu meio substituído por meio DMEM fresco suplementado com 10% SFB, permanecendo neste por 48 horas. A esse novo grupo foi dado o nome de recuperado, apresentando um índice de viabilidade de 92,4% (Figura 8).

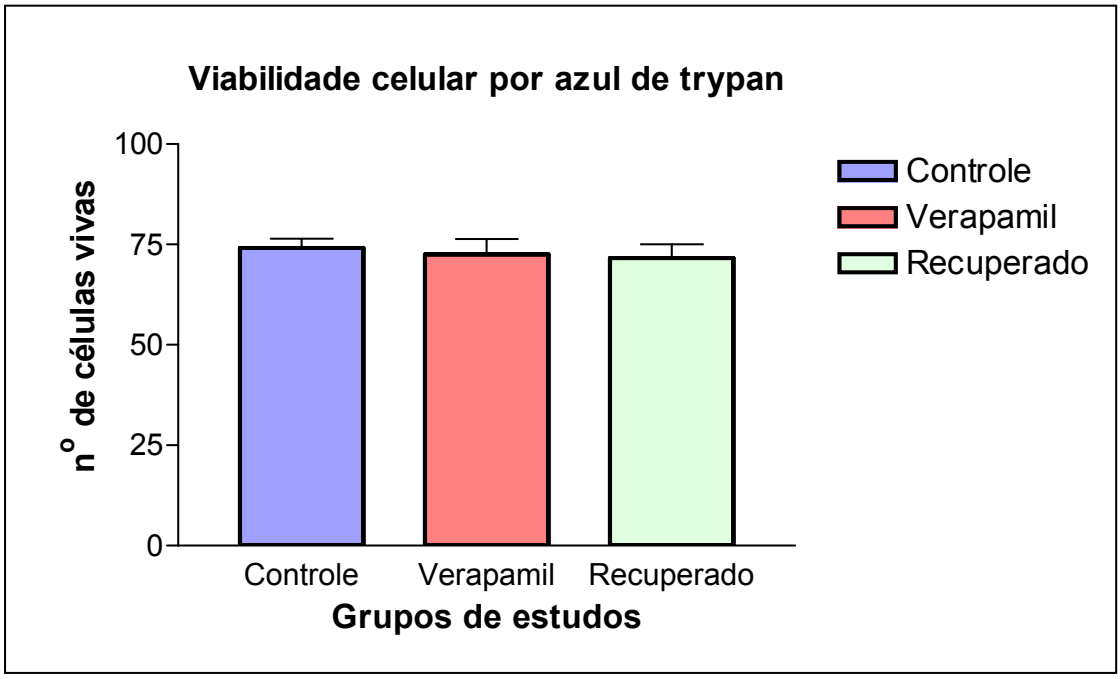

Figura 8 – Índice de viabilidade analisado pelo método de exclusão de células inviáveis por azul de trypan nos grupos controles, tratados e recuperados, não apresentando diferenças significativamente estatísticas (p>0,05).

4.4.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR IMUNOFLUORESCÊNCIA (IODETO DE PROPÍDIO)

Para análise da viabilidade celular por imunofluorescência, a exemplo do estudo com o azul de trypan, foram criados 3 grupos: um grupo controle, no qual os fibroblastos foram mantidos em DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos por 48 horas; um grupo tratado, ao qual foi acrescido verapamil 50 μM por 48 horas e um grupo recuperado, que após 48 horas de tratamento, teve seu meio trocado por DMEM fresco suplementado com 10% SFB por 48 horas. As células vivas tiveram seus núcleos corados pelo DAPI, enquanto que, as células mortas tiveram seu núcleo corado pelo iodeto de propídio. As imagens e a contagem das células

foram realizadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) (Figura 9). A análise dos dados mostrou uma porcentagem de células vivas de 98,3%, 96,27% e de 96,32% para os grupos controle, tratados e recuperados, respectivamente (Figura 10).

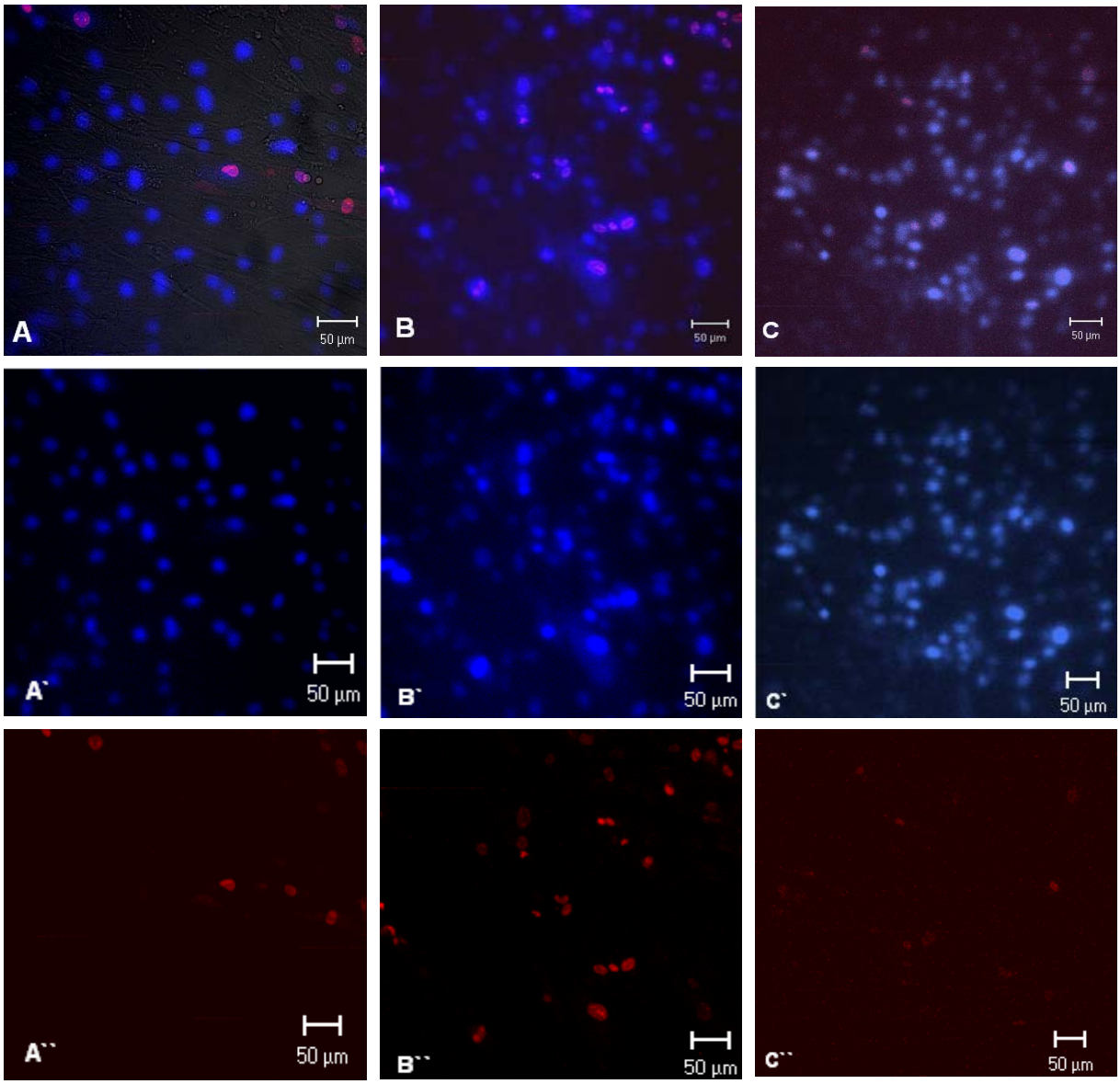

Figura 9 – Imagem obtida ao microscópio confocal de varredura a laser mostrando as células viáveis, com seus núcleos corados em azul pelo DAPI, e as células inviáveis, com seus núcleos corados em vermelho pelo iodeto de propídio. A, A`e A`` correspondem às células controles; B, B`e B`` às células tratadas com verapamil 50 µM e C, C` e C`` às células recuperadas.

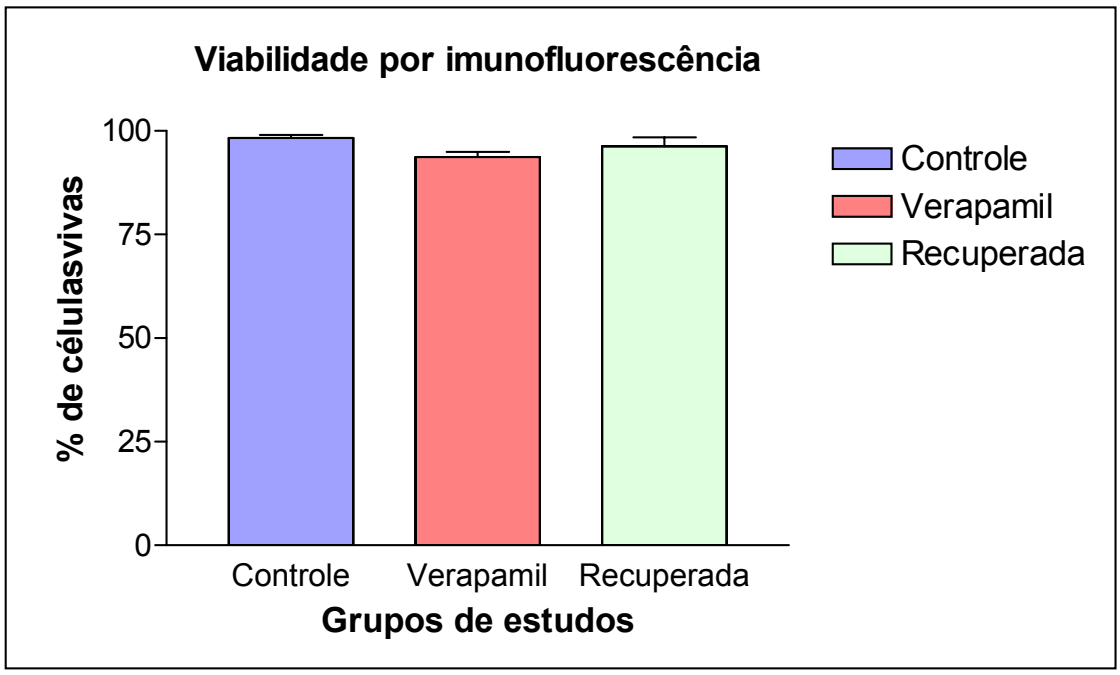

Figura 10 - Índice de viabilidade analisado por imunofluorescência de células controles, tratadas com verapamil 50 μM e recuperados, não apresentando diferenças significativamente estatísticas (p>0,05).

4.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO VERAPAMIL SOBRE O CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS

4.5.1 MICROFILAMENTOS

As diferenças morfológicas entre fibroblastos controles e tratados (Figura 11A e D), analisadas ao microscópio invertido de contraste de fase, puderam ser também observadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Figura 11C e F), sendo os fibroblastos controles fusiformes, e os tratados, mais arredondados. A análise do citoesqueleto foi realizada a partir de preparações citológicas coradas com faloidina-FITC. Nas culturas controles os filamentos de actina apresentaram-se como fibras de estresse, estando dispostos em feixes paralelos, organizadamente distribuídos por toda a célula, ao longo do seu maior eixo (Figura 11B e C). Quando os

fibroblastos foram incubados com 50 μM de verapamil, foi possível notar, com 2 horas de tratamento, discreta modificação no padrão de organização dos filamentos de actina. Após 12 horas de incubação, as modificações estavam mais evidentes. O efeito máximo da droga foi observado com 48 horas, tempo este, no qual a modificação no padrão de organização dos filamentos e as alterações na morfologia celular puderam ser bem caracterizadas. As células tratadas passaram a apresentar filamentos de actina com um padrão mais aleatório de distribuição, estando os filamentos direcionados ao longo de vários eixos (Figura 11E e F). O padrão de fibras de estresse foi mantido no córtex celular, onde os microfilamentos puderam ser bem identificados (Figura 11F).

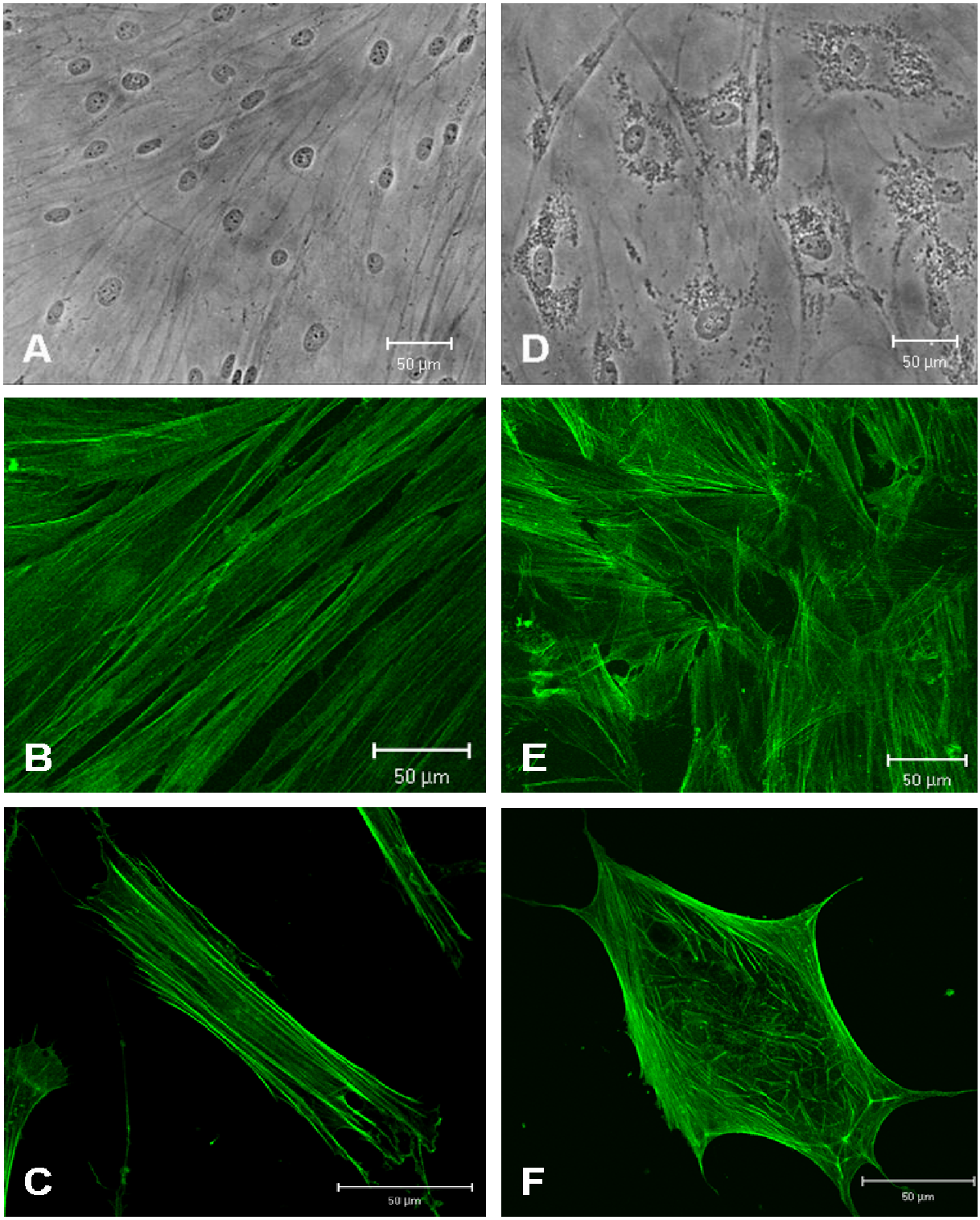

Figura 11 – A e D correspondem a imagens obtidas ao microscópio invertido de contraste de fase, evidenciando as diferenças morfológicas entre células controles (A) e tratadas (D). B e C mostram o padrão de organização dos filamentos de actina de células controles (fibras de estresse) e E e F mostram a modificação no padrão de organização destes mesmos filamentos nas células tratadas. As imagens B, C, E e F foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

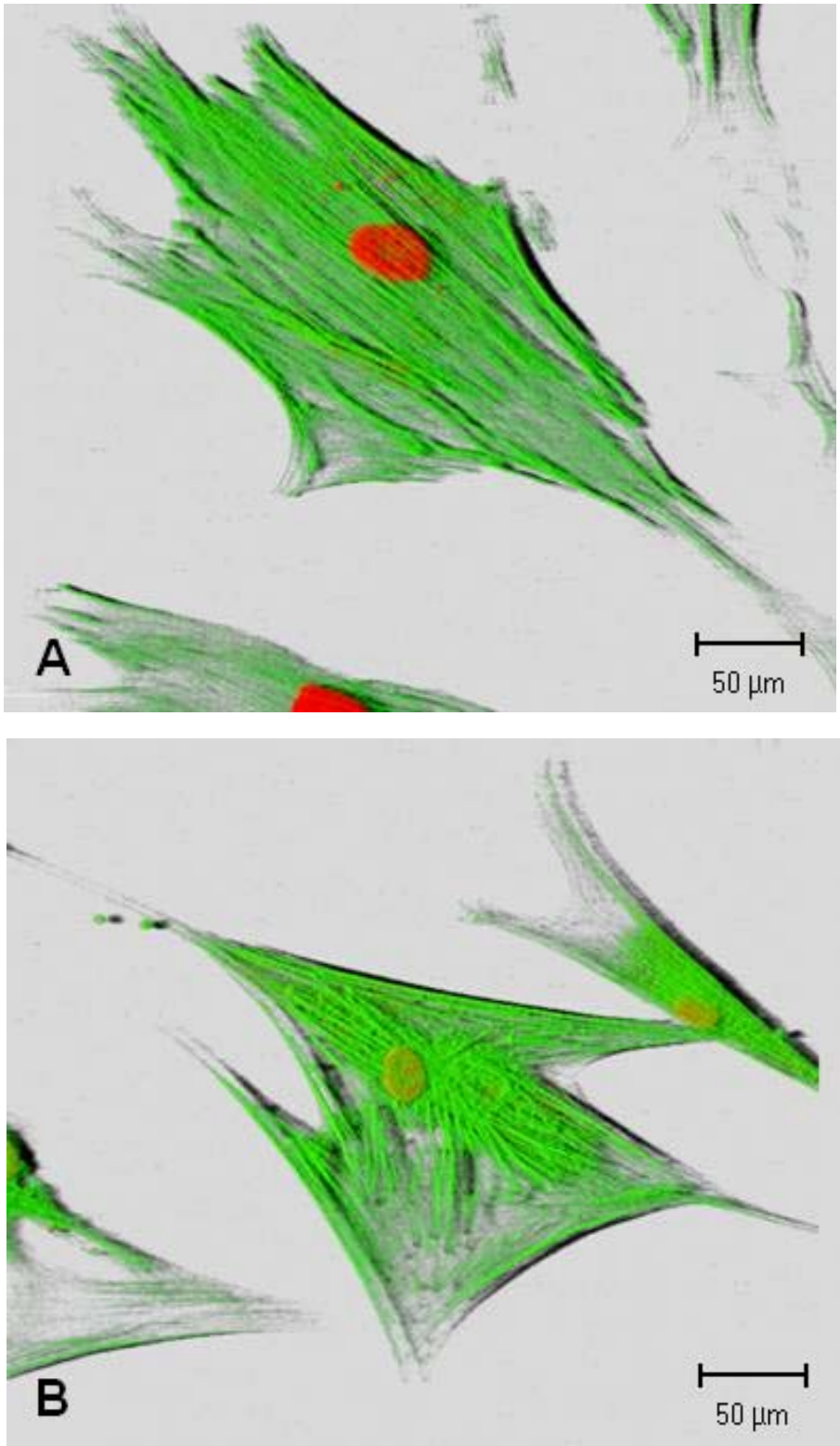

Figura 12 – Imagem, ao microscópio confocal de varredura a laser (reconstrução 3D), de um fibroblasto submetido à incubação com 50 µM de verapamil, por 48 horas (B). Nota-se a modificação no padrão de organização dos filamentos de actina, originalmente dispostos em feixes paralelos (A), e a conseqüente alteração da forma da célula.

4.5.2 MICROTÚBULOS

Após a adequada caracterização da influência do verapamil sobre o padrão de organização dos filamentos de actina, foi analisada a ação da droga sobre os demais filamentos do citoesqueleto. Submetidas à imunofluorescência com faloidina-FITC ou TRITC e anticorpos anti-tubulina α, células controles e células tratadas apresentaram microtúbulos com o mesmo padrão de organização, estando os mesmos dispostos em forma de rede, regularmente distribuídos por toda a célula. Nota-se alteração no padrão de organização dos filamentos de actina nas células tratadas, com a presença de fibras de estresse no córtex celular e de diminutas granulações na região perinuclear (Figura 13).

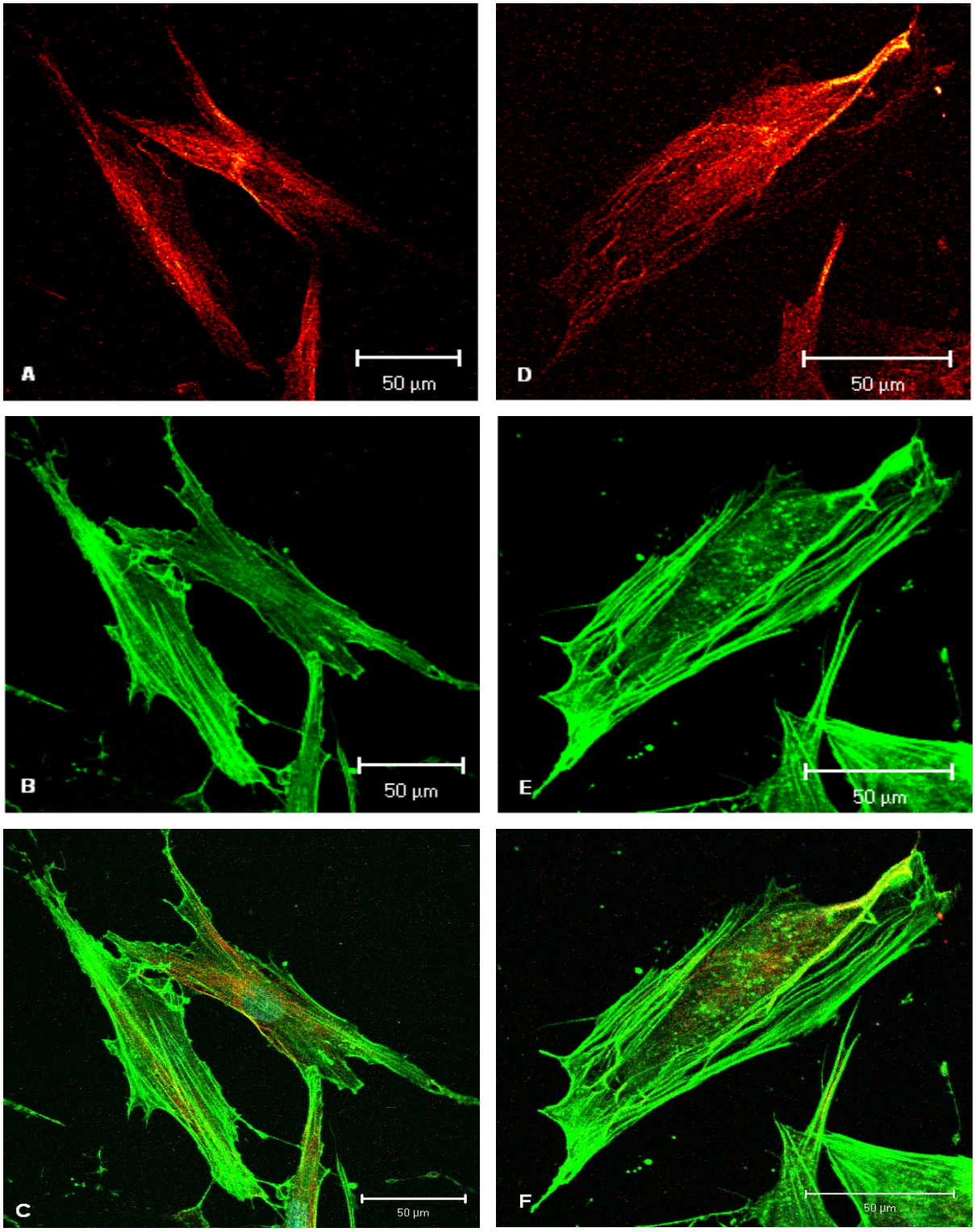

Figura 13 – Imagem feita ao microscópio confocal de varredura a laser, mostrando o padrão de organização dos microtúbulos e dos filamentos de actina de fibroblastos controles e tratados com 50 µM verapamil, por 48 horas. Nota-se, a manutenção do padrão de organização da tubulina nas células controle e nas células tratadas, com actina localizada no córtex celular, predominantemente.

4.5.3 FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Na figura 14 os filamentos de actina mostram as mesmas alterações no padrão de organização anteriormente descritas para as células tratadas. Nota-se uma discreta alteração na organização dos filamentos intermediários (vimentina), que passaram a apresentar característica granular.

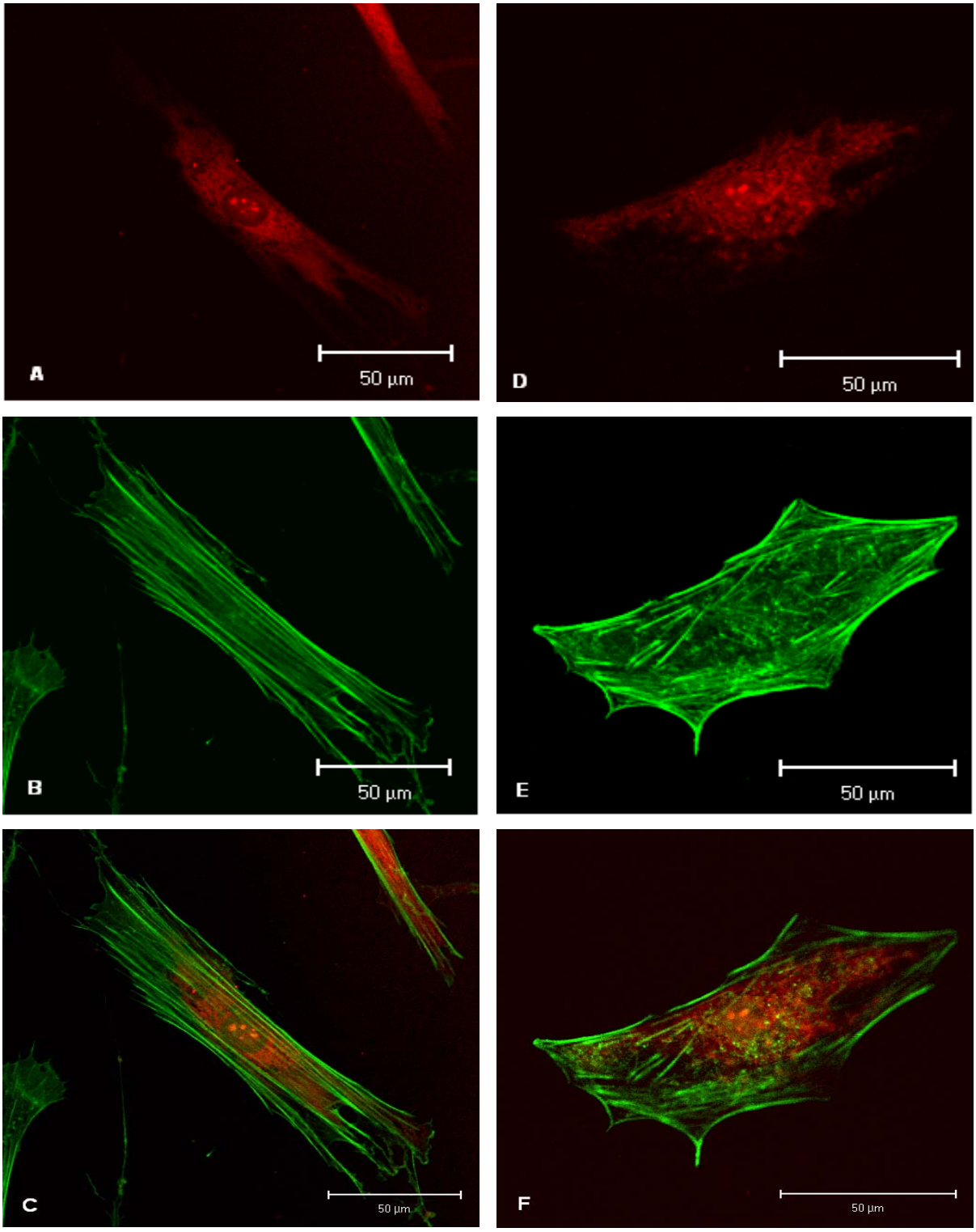

Figura 14 – Imagem obtida ao microscópio confocal evidenciando o padrão de organização da vimentina em células controles e tratadas. Nota-se o aspecto mais granular da vimentina nos fibroblastos tratados com o verapamil (D e F).

4.6 CONTATOS FOCAIS

A figura 15 mostra micrografias de imunofluorescência de células controles e tratadas com 50 μM de verapamil. As células tiveram os filamentos de actina corados com faloidina-TRITC (vermelho), sendo a vinculina corada por anticorpos específicos (anti-vinculina) a esta proteína de ancoramento (verde). Os núcleos das células foram corados com ToPro 3 (azul). Nas células controles foi possível notar a presença da vinculina associada aos contatos focais (Figura 15A), enquanto que, os filamentos de actina terminavam na membrana plasmática, mantendo o padrão de fibras de estresse por toda a célula, ao longo de seu maior eixo (Figura 15B). Nas células tratadas com o verapamil, não foi possível observar a marcação de vinculina associada aos contatos focais (Figura 15D). A actina apresentou o mesmo comportamento anteriormente descrito, com fibras de estresse apenas junto ao córtex celular (Figura 15E).

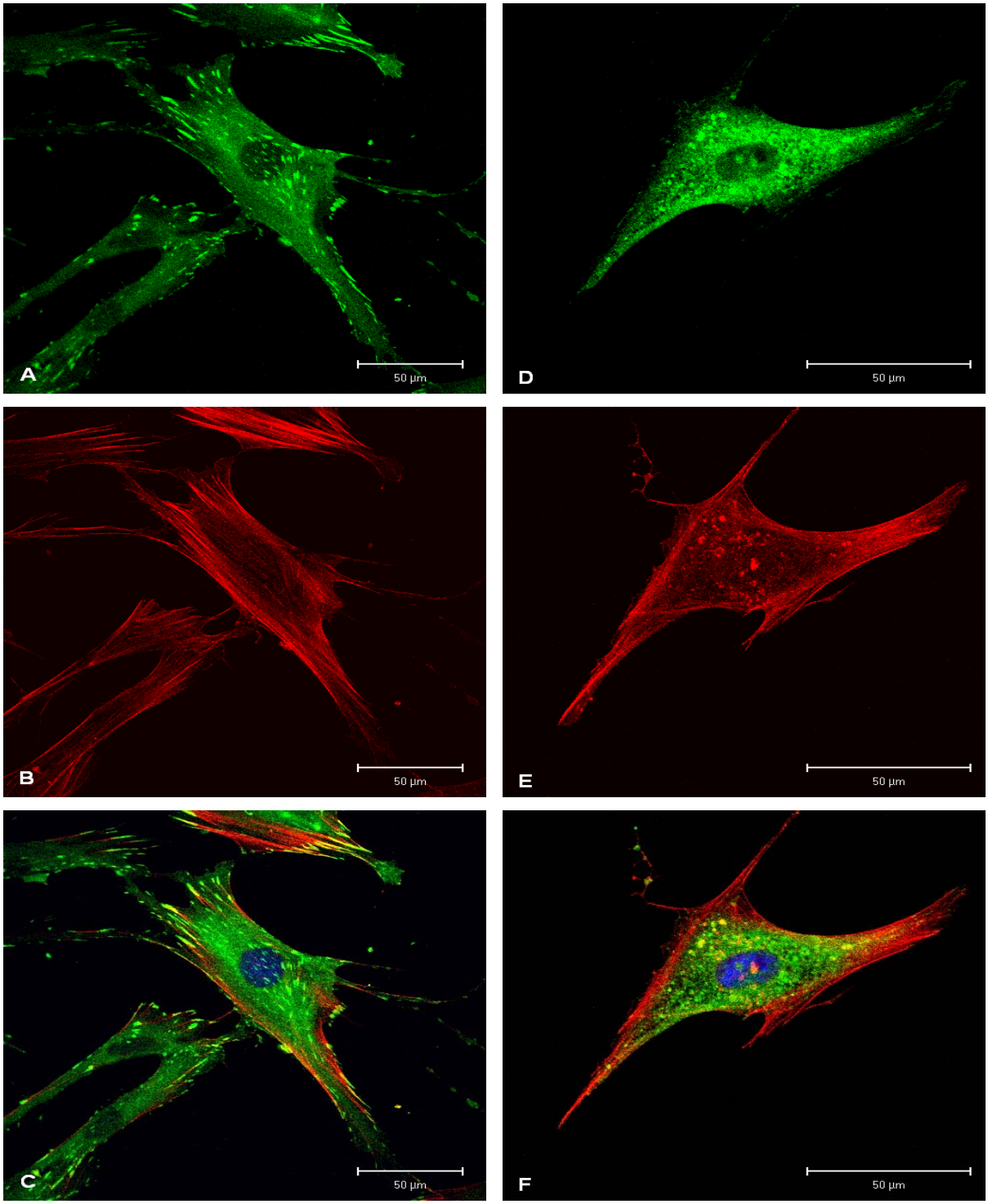

Figura 15 – Fotomicrografias de imunofluorescência de fibroblastos controles e tratados com 50 µM verapamil, evidenciando a proteína de ancoramento intracelular vinculina. Nas células controles, a vinculina e, conseqüentemente, os contatos focais, foram bem caracterizados (A e C), não ocorrendo o mesmo nas células tratadas (D e F).

As alterações induzidas pelo verapamil puderam ser melhor observadas na figura 16 que mostra uma fotomicrografia de imunofluorescência de um fibroblasto tratado com 50 μM verapamil em maior aumento. Nota-se na região perinuclear a ausência de reforços fluorescentes (verdes) compatíveis com os contatos focais (vinculina), assim como, o não aparecimento das fibras de estresse, que normalmente cruzam, de maneira organizada, todo o citoplasma da célula. Nota-se ainda, na projeção citoplasmática que se estende a partir do pólo superior da célula, a presença dos filamentos de actina (vermelhos), terminando na membrana plasmática e nas extremidades destes, os contatos focais, marcados por anticorpos específicos à vinculina.

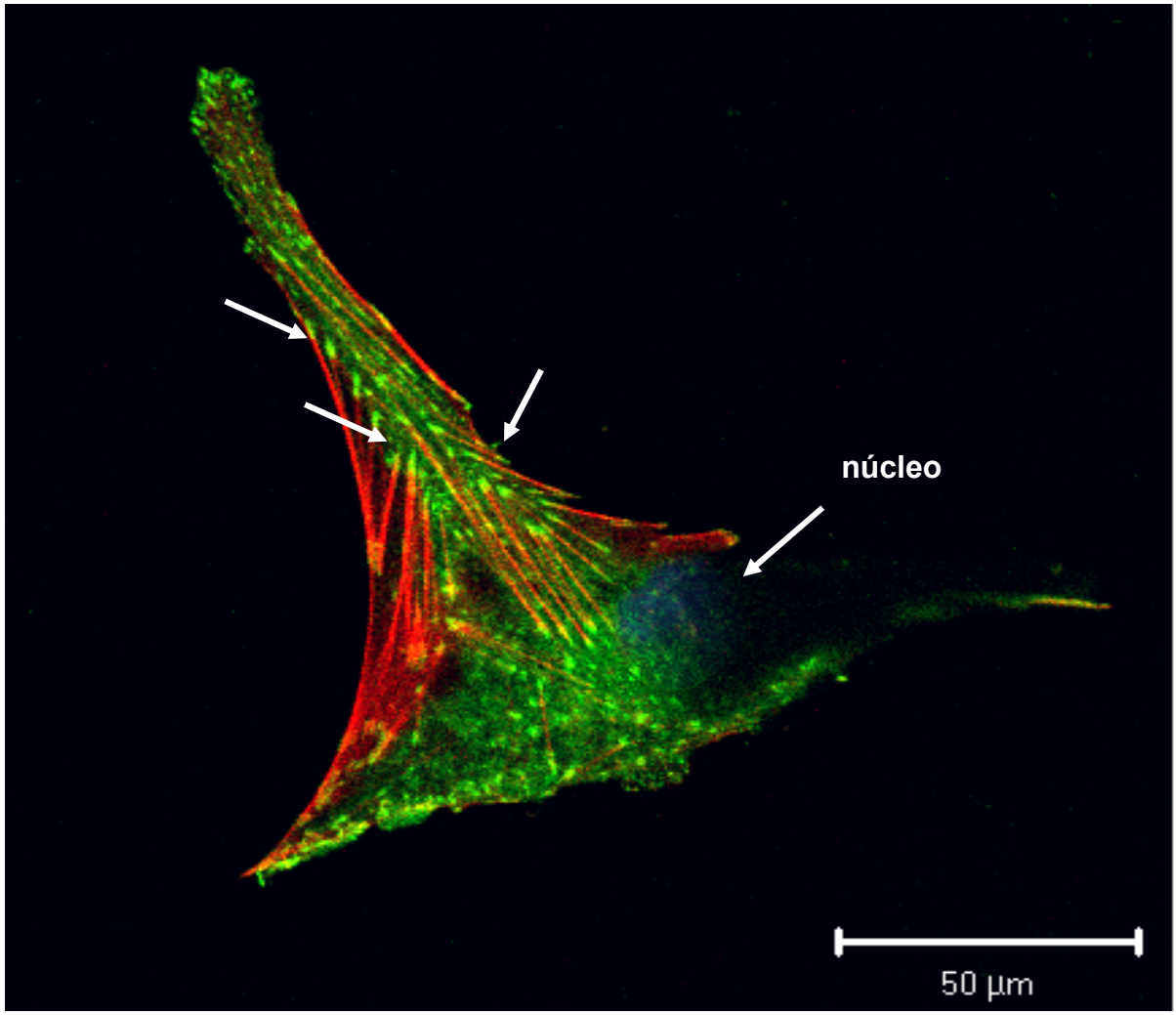

Figura 16 - Fotomicrografia de fibroblasto tratado evidenciando os contatos focais (vinculina), os filamentos de actina (vermelho) e as relações entre eles, junto à membrana plasmática (pontas das setas).

4.7 CÁLCIO

4.7.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA

Considerando que o verapamil atua bloqueando a entrada de cálcio na célula, via canais de cálcio, alterando assim a concentração citosólica deste íon, fibroblastos em cultura foram incubados com *calcium green*, um marcador específico para cálcio (verde). A figura 17 mostra ao microscópio confocal de varredura a laser, fibroblastos controles com fluorescência mais intensa e regularmente distribuída pelas células (A), em comparação com os fibroblastos tratados com verapamil 50 μM (B).

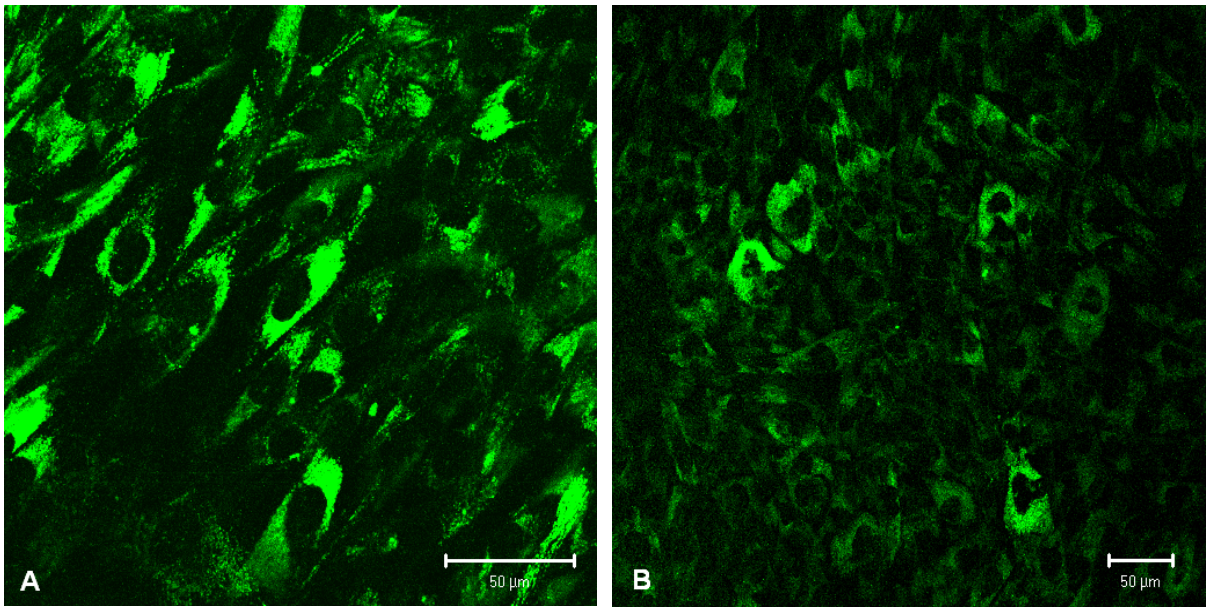

Figura 17 – Fotomicrografia feita ao microscópio confocal de varredura a laser mostrando a fluorescência do *calcium green* em células controles (A) e tratadas com verapamil 50 μM.

Complementando a análise anterior, os fibroblastos marcados com o *calcium green* tiverem suas membranas plasmáticas e núcleos marcados pelo DilC18 (vermelho) e pelo DAPI (azul), respectivamente (Figura 18).

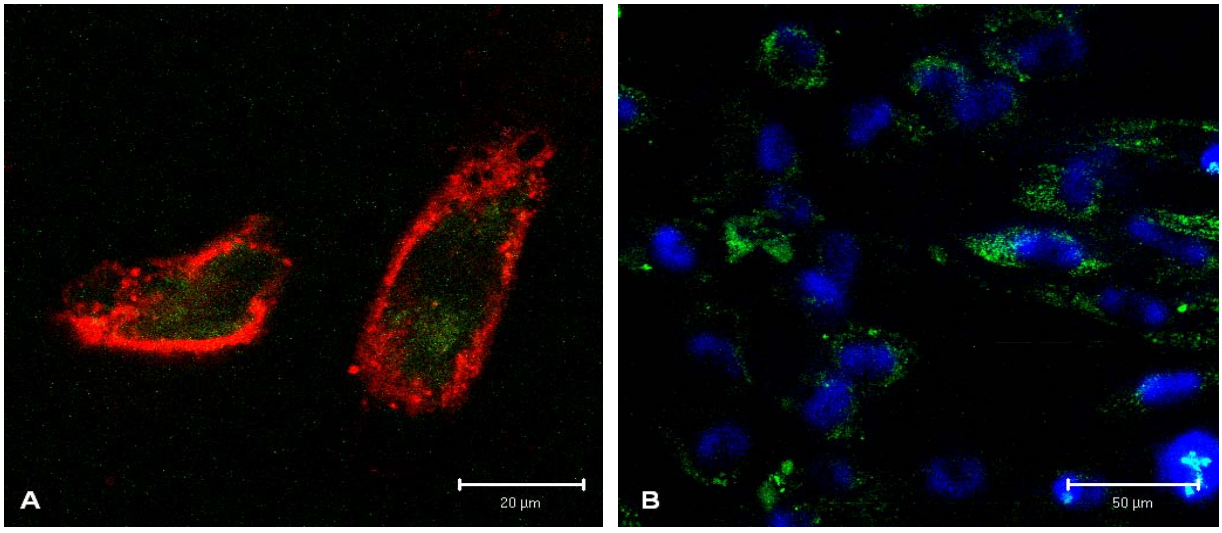

Figura 18 – Imagens, ao microscópio confocal, da membrana ($DilC_{18}$) (A) e do núcleo (DAPI) (B) de fibroblastos controles submetidos ao *calcium green*

Uma vez evidenciada a existência de diferentes intensidades de fluorescência entre fibroblastos controles e tratados, passou-se a utilizar ferramentas específicas do microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM510), a fim de melhor explorar essas informações.

A partir da utilização do software pseudo-3D LSM510 do microscópio confocal, as informações sobre a variação de intensidade de fluorescência entre fibroblastos controles e tratados, puderam ser comprovadas. Os fibroblastos

controles apresentaram-se ao microscópio confocal como células fusiformes, de fluorescência intensa e homogênea, igualmente distribuída por toda a célula (Figura 19A), gerando gráficos, na visão frontal (Figura 19B) e pseudo-3D (Figura 19C), com graduações de intensidade de fluorescência bem definidas, sendo atingida a fluorescência máxima após as células terem sido incubadas com o *calcium green,* por 35 minutos. Quando os fibroblastos tratados com o verapamil 50 μM, por 48 horas, foram analisados, observou-se que as células apresentavam morfologia mais arredondada, com fluorescência reduzida e irregular, além da presença de grumos predominantemente perinucleares (Figura 19D). Ao serem analisadas pelo software pseudo-3D LSM510, e, após terem passados pelo mesmo tempo de incubação com o *calcium green* que as células controles (35 minutos), os gráficos frontal (Figura 19E) e pseudo-3D (Figura 19F), mostraram fluorescências de menor intensidade.

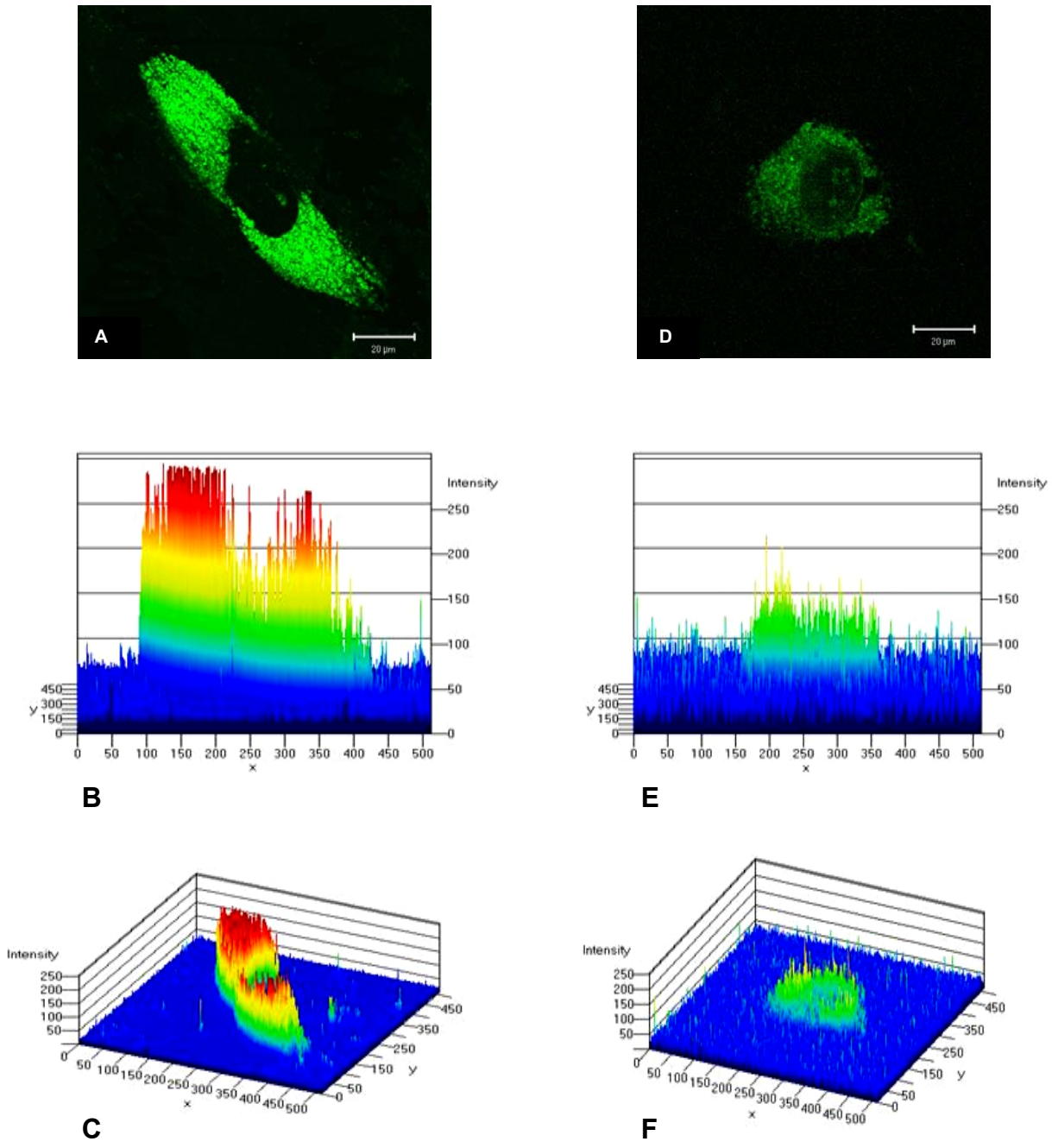

Figura 19 – Imagens ao microscópio confocal de fibroblastos controle e tratado submetidos ao *calcium green*. A fluorescência no fibroblasto controle mostrou-se mais intensa e homogênea, quando comparada à fluorescência do fibroblasto tratado com 50 μM de verapamil.

4.7.2 ANÁLISE DA DINÂMICA DA FLUORESCÊNCIA

A fim de se caracterizar a dinâmica do *calcium green*, no que se refere à marcação do cálcio citosólico, bem como diferenças na intensidade da fluorescência entre fibroblastos controle e tratados, células em cultura foram analisadas por um período de 60 minutos, em intervalos de 5 minutos. Os fibroblastos controles, a partir do tempo zero, apresentaram fluorescência crescente, atingindo valor máximo por volta de 35 minutos, enquanto que, os fibroblastos tratados, atingiram a intensidade máxima de fluorescência, aos 45 minutos. Apesar das diferenças nos tempos de intensidade máxima, ambas as células, controles e tratadas, apresentaram curvas crescentes de fluorescência, sendo, no entanto, a fluorescência das células tratadas sempre menos intensa que as das células controles. Posteriormente, as imagens foram analisadas através de softwares do micrsocópio confocal, a saber: software *profile*, que avalia a intensidade de fluorescência através de uma linha traçada sobre a área de interesse, identificando os pontos de maior e menor fluorescência (Figura 20); software *histogram analysis,* que avalia a intensidade de fluorescência de uma determinada área em freqüência por intensidade de pixels (0 a 256) (Figura 21) e o software *pseudo-3D* LSM510, que avalia a intensidade de fluorescência (pixels), a partir de gráficos construídos em uma projeção 2.5D (pseudo-3D) (Figura 22).

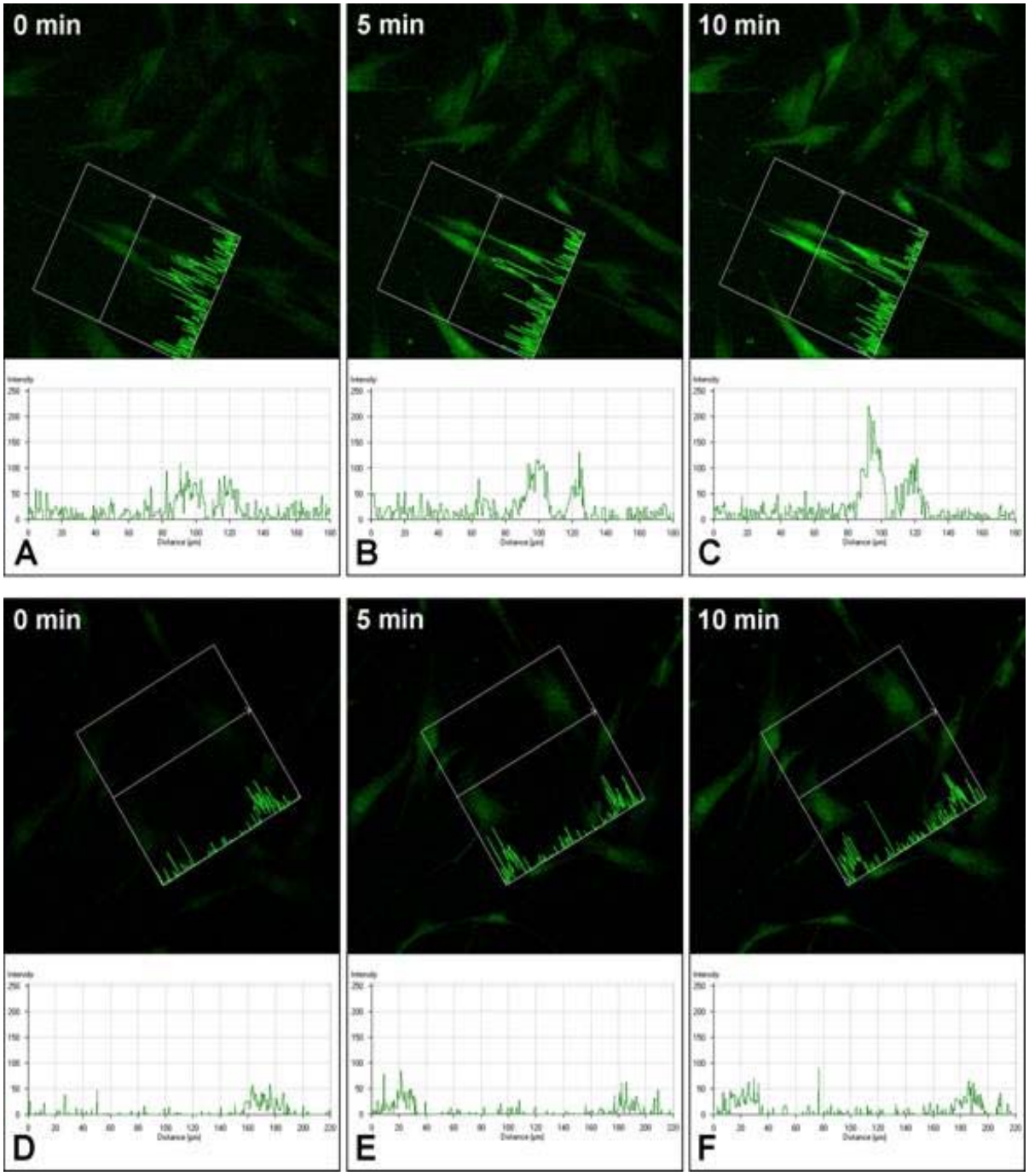

Figura 20 – Análise do perfil da intensidade de fluorescência de células controles (A, B e C) e tratadas (D, E e F), marcadas pelo *calcium green,* utilizando-se o módulo *profiles* do microscópio confocal de varredura a laser.

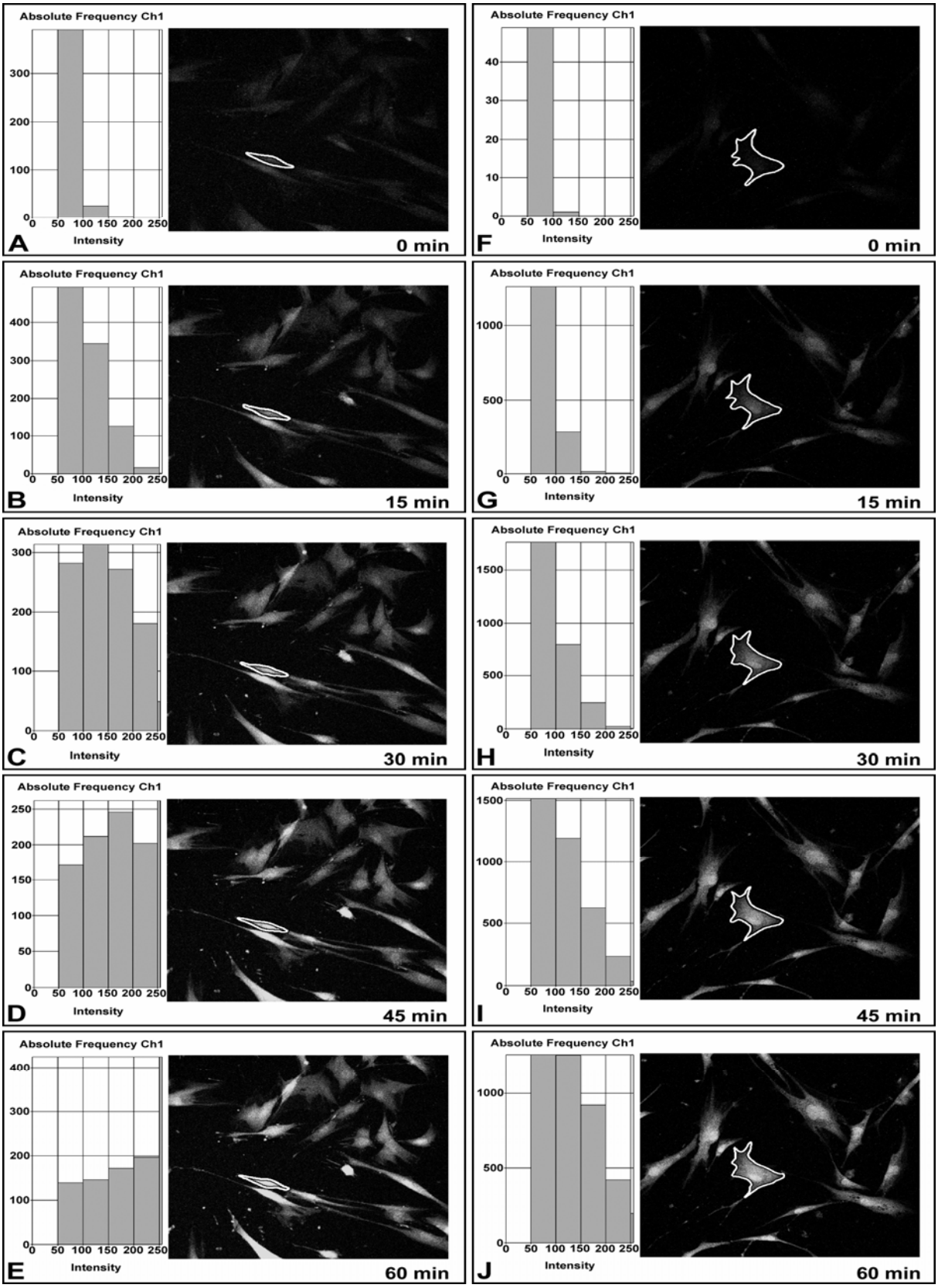

Figura 21 – Análise da intensidade de fluorescência de células controles (A, B, C, D e E) e tratadas (F, G, H, I e J), marcadas pelo *calcium green,* utilizando-se o módulo *histogram analysis* do microscópio confocal de varredura a laser.

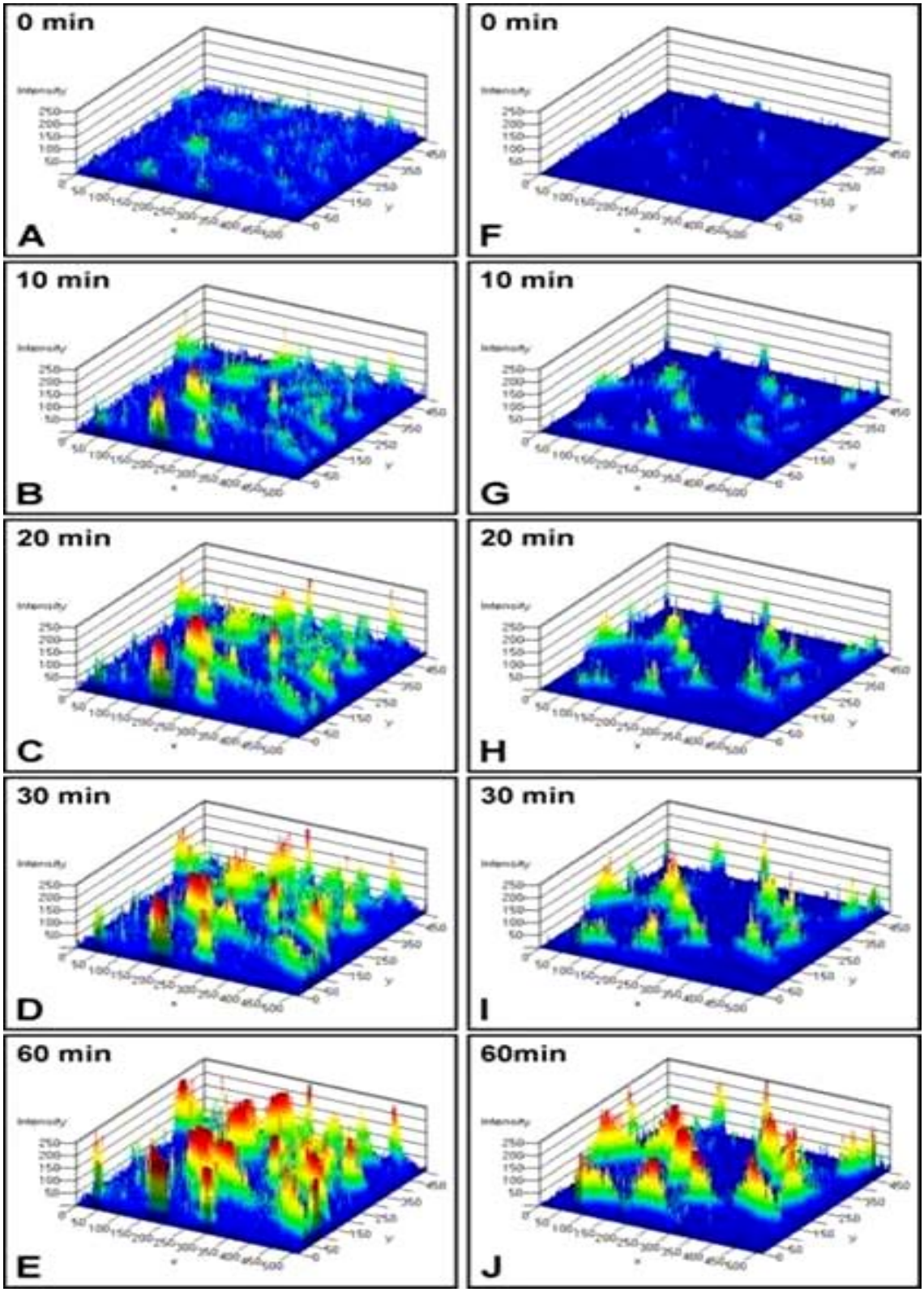

Figura 22 - Imagens seqüenciais da variação da intensidade de fluorescência do *calcium green.* As variações de fluorescência foram transformadas em gráficos pseudo 3-D através de módulo específico no microscópio confocal. Os gráficos em escala de cinza foram coloridos, variando entre azul (menores valores) e vermelho (maiores valores). Células controle (A, B, C, D e E) e células tratadas com 50 μM de verapamil (F, G, H, I e J).

4.7.3 INCUBAÇÃO DOS FIBROBLASTOS EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO

A fim de comprovar que as mudanças morfológicas e fisiológicas sofridas pelos fibroblastos tratados com verapamil deveram-se às alterações citosólicas do íon cálcio, culturas de fibroblastos foram submetidas à incubação em meios, com diferentes concentrações de cálcio. Inicialmente quatro culturas de curta duração foram estabelecidas até a subconfluência em meio DMEM. No tempo zero, duas das culturas tiveram seus meios trocados por MCDB (baixa concentração de cálcio) e DMEM/EGTA (quelante de cálcio). Uma das culturas, considerada como controle, não teve seu meio alterado, permanecendo em DMEM. Após 48 horas de incubação, a cultura controle manteve seu padrão inicial, caracterizada por fibroblastos fusiformes e alongados (Figura 23A e B). As culturas que tiveram seus meios substituídos por DMEM/EGTA (Figura 23C e D) e pelo MCDB (Figura 23E e F), após 48 horas, passaram a apresentar fibroblastos com morfologia mais arredondada, similar à apresentada pelos fibroblastos tratados com verapamil.

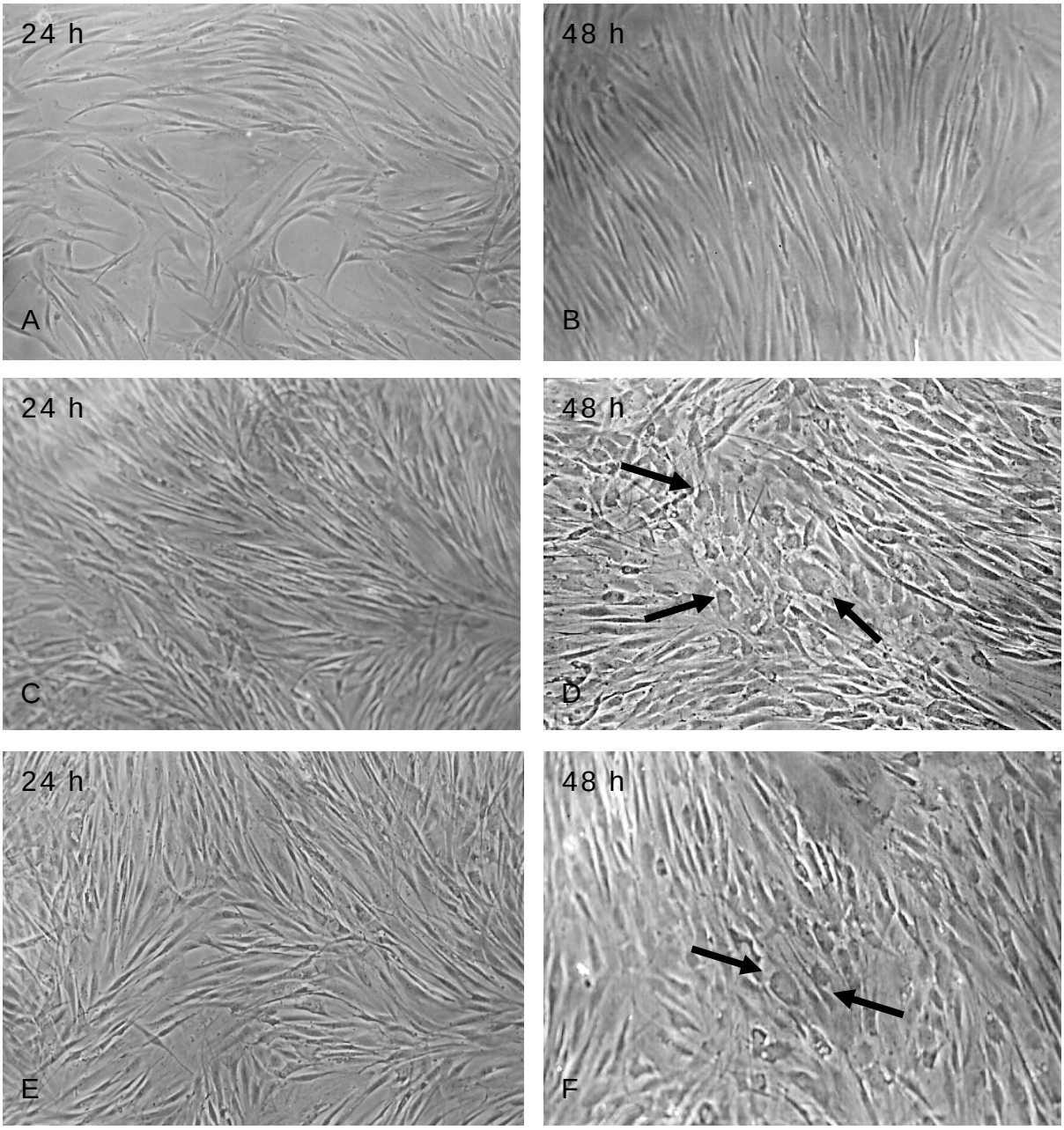

Figura 23 – Micrografias ao microscópio invertido de contraste de fase de fibroblastos controle em DMEM (A e B), EGTA (C e D) e MCDB 153 (E e F), após 24 horas (A, C e E) e 48 horas (B, D e F). As setas indicam alguns dos fibroblastos que tiveram suas morfologias alteradas, assumindo um formato mais arredondado.

4.8 COLAGENASE

Após ter sido realizada a análise da influência do verapamil sobre a morfologia, organização do citoesqueleto e concentração citosólica do cálcio em fibroblastos em cultura, foi estudada a ação da referida droga sobre a síntese, bem como sobre a atividade da colagenase.

4.8.1 ZIMOGRAFIA DE CASEÍNA

Foi realizada a zimografia de caseína do meio condicionado de culturas de fibroblastos controles e tratados com 50 μM de verapamil. O gel revelou bandas gelatinolíticas com peso correspondente ao da MMP-I (Figura 24, topo da figura). A densitometria das bandas, realizada através do software de domínio público *Image J*, mostrou que o verapamil induz um aumento significativo (10X) da atividade da MMP-I, quando comparada às células controles não tratadas.

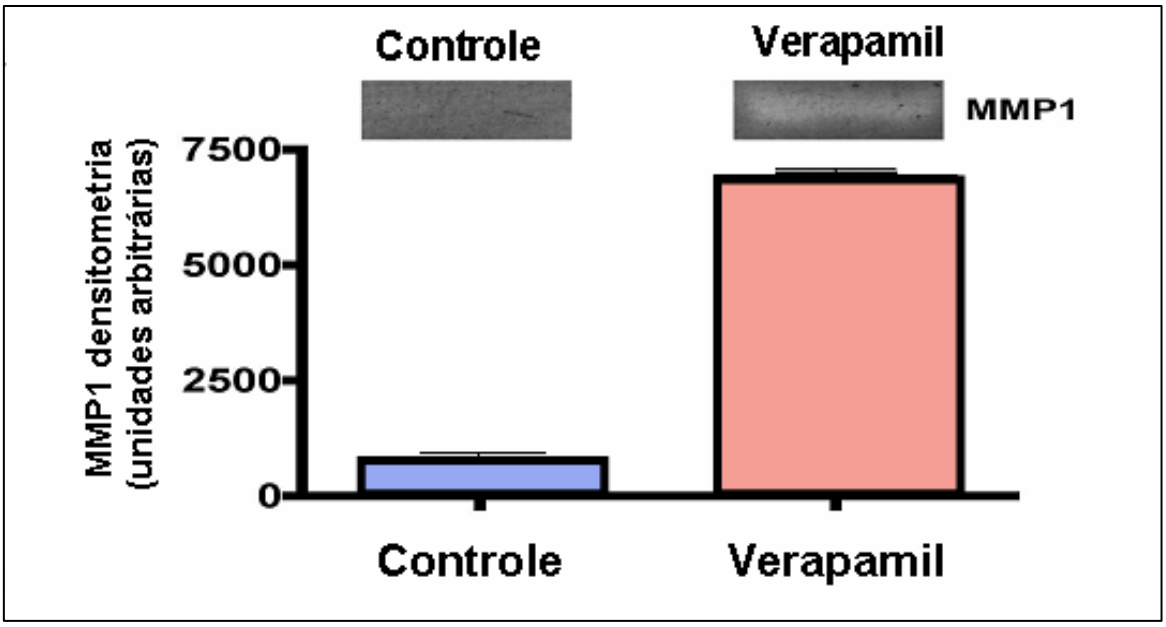

Figura 24 – A zimografia de caseína mostrou bandas gelatinolíticas correspondentes com o peso molecular da MMP-I (topo da figura), indicando um aumento de 10x de sua atividade nos grupos tratados com o verapamil (p<0,0001).

4.8.2 ATIVIDADE DA COLAGENASE

O resultado obtido com a zimografia de caseína foi confirmado com um ensaio de atividade da colagenase (Figura 25) O ensaio do meio condicionado demonstrou que o verapamil induziu a um aumento de 3x na produção de MMP-I quando comparado ao grupo controle.

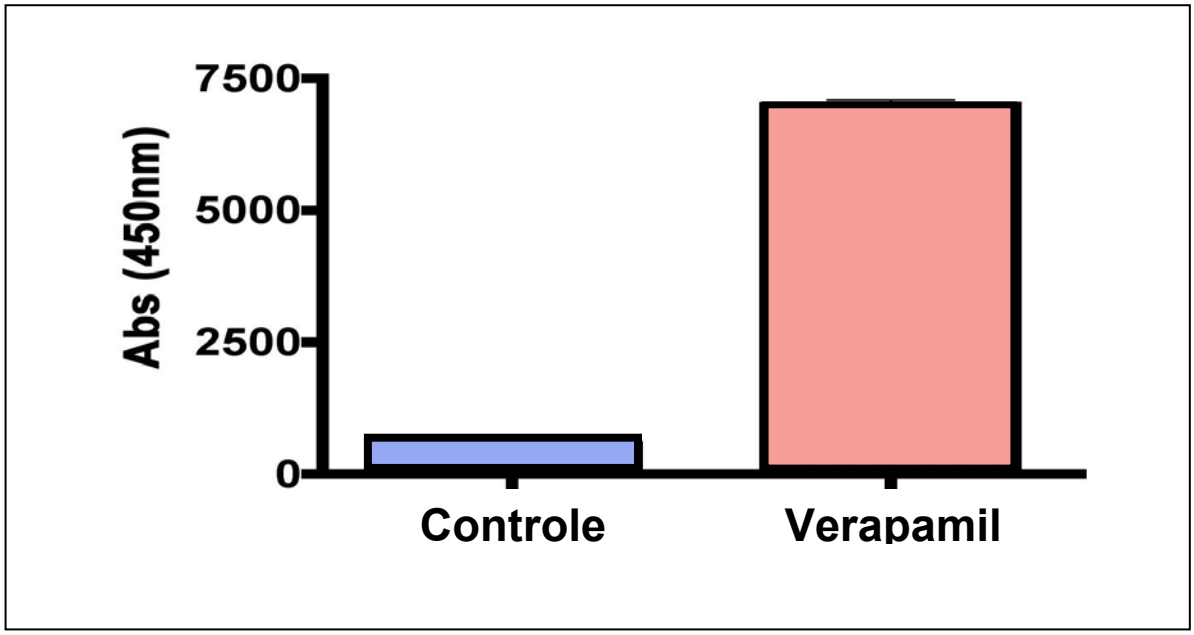

Figura 25 – Análise da concentração de MMP-I medida por absorbância, evidenciando um aumento de 3x na produção de MMP-I nos grupos tratados com o verapamil ($p<0,0001$).

4.8.3 “IMMUNOBLOT”

Complementando os resultados anteriores, foi realizado “immunoblot” da MMP-I do meio condicionado e do lisado de células (Figura 26). O “immunoblot” foi reativo somente para o grupo de células tratado com o verapamil (parte de baixo da figura). A β-actina foi utilizada como controle.

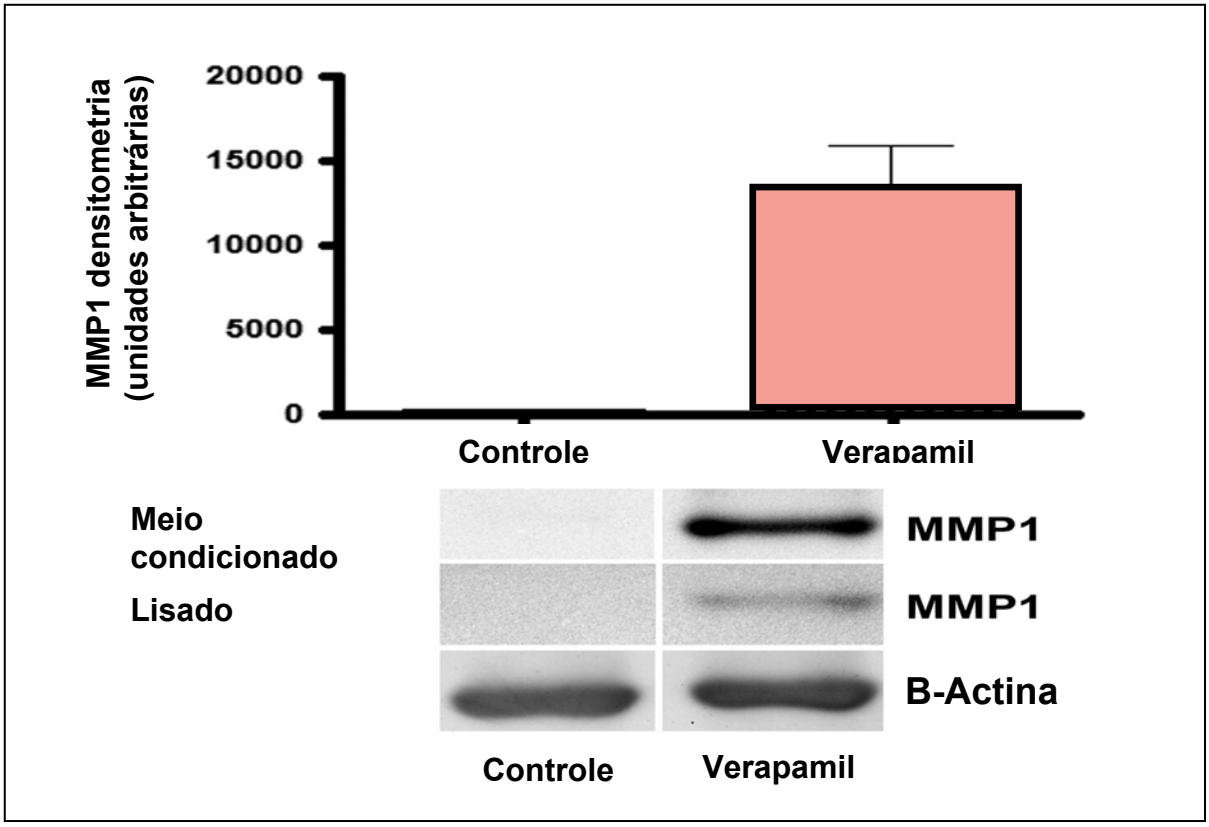

Figura 26 – "Immunoblot" do meio condicionado e do lisado de células evidenciando a presença de bandas apenas no grupo de células tratadas com o verapamil. A β-actina foi utilizada como controle ($p<0,0001$).

4.9 COLÁGENO E PROCOLÁGENO

Fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados na presença e na ausência de verapamil. Após a fixação, os fibroblastos foram incubados com anticorpos anti-colágeno I para mensuração da biossíntese de colágeno por imunofluorescência. Vale a pena lembrar que as células não tiveram suas membranas plasmáticas permeabilizadas. Quando comparados os dois grupos de células, foi possível observar que no grupo controle a fluorescência mostrava-se mais intensa, com pequenos grânulos junto à membrana plasmática (Figura 27A), enquanto que, no

grupo tratado a fluorescência mostrava-se menos intensa, não estando os grânulos tão bem caracterizados (Figura 27B).

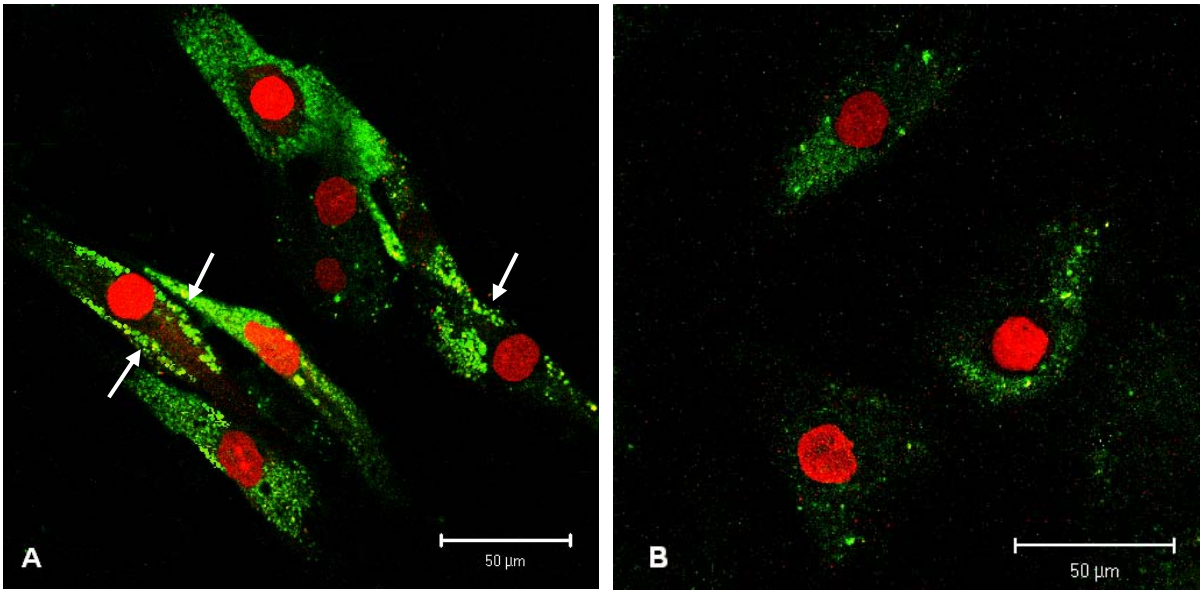

Figura 27 – Ilustra o efeito do verapamil sobre a quantidade de colágeno em fibroblastos controle (A) e tratados com 50 µM de verapamil (B), por 48 horas. Nota-se, no grupo controle, fluorescência mais intensa e, de forma melhor caracterizada, os grânulos junto à membrana plasmática (setas).

Para avaliação da influência do verapamil sobre o procolágeno, fibroblastos controles e tratados foram incubados com anticorpo anti-procolágeno I, após terem sido fixados e permeabilizados com Triton X-100. A análise por imunofluorescência ao microscópio confocal de varredura a laser mostrou que os fibroblastos controle apresentavam fluorescência mais intensa, quando comparados aos fibroblastos do grupo tratado. A figura 28 mostra essa diferença de fluorescência entre os grupos.

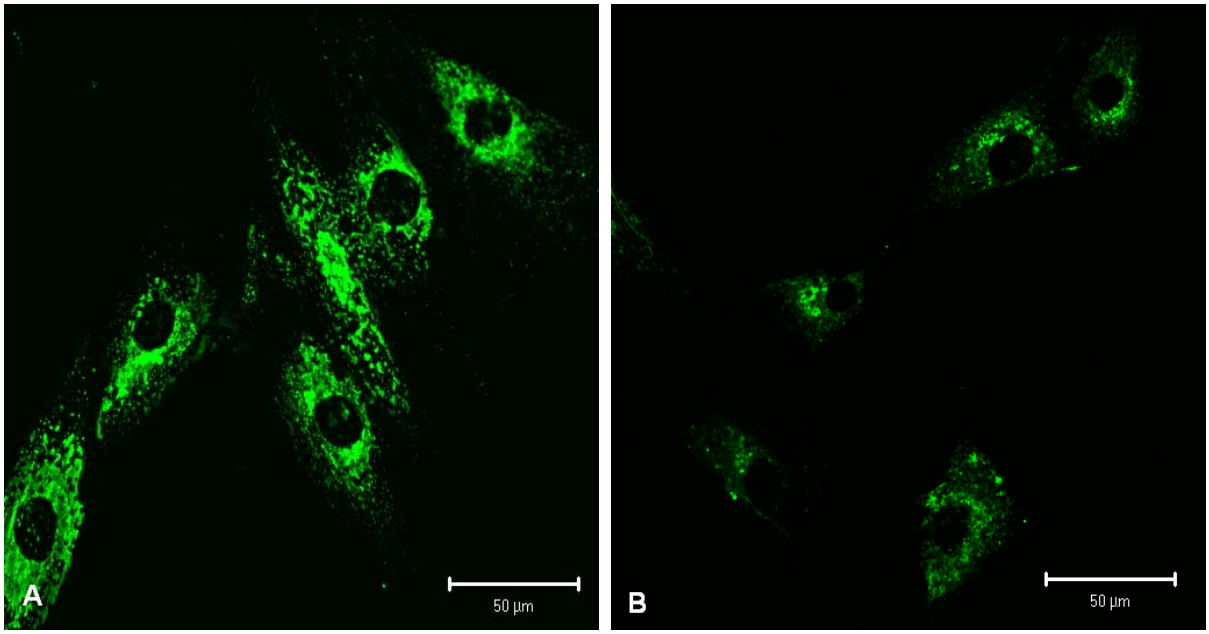

Figura 28 – Fotomicrografias obtidas ao microscópio confocal (Zeiss LSM510) de fibroblastos controle (A) e tratados com 50 µM de verapamil (B), por 48 horas. Nota-se, no grupo controle, um padrão de fluorescência mais intenso, sugerindo uma possível redução na quantidade de procolágeno nos fibroblastos tratados.

A fim de complementar a análise do colágeno I, foi realizado *immunoblot* do lisado de fibroblastos controles e tratados com verapamil. O resultado obtido foi similar ao mostrado pela análise por imunofluorescência, com o verapamil exercendo um possível efeito inibitório sobre a síntese de colágeno I. A figura 29 mostra um gráfico evidenciando as diferenças na biossíntese de colágeno I entre fibroblastos controles e tratados.

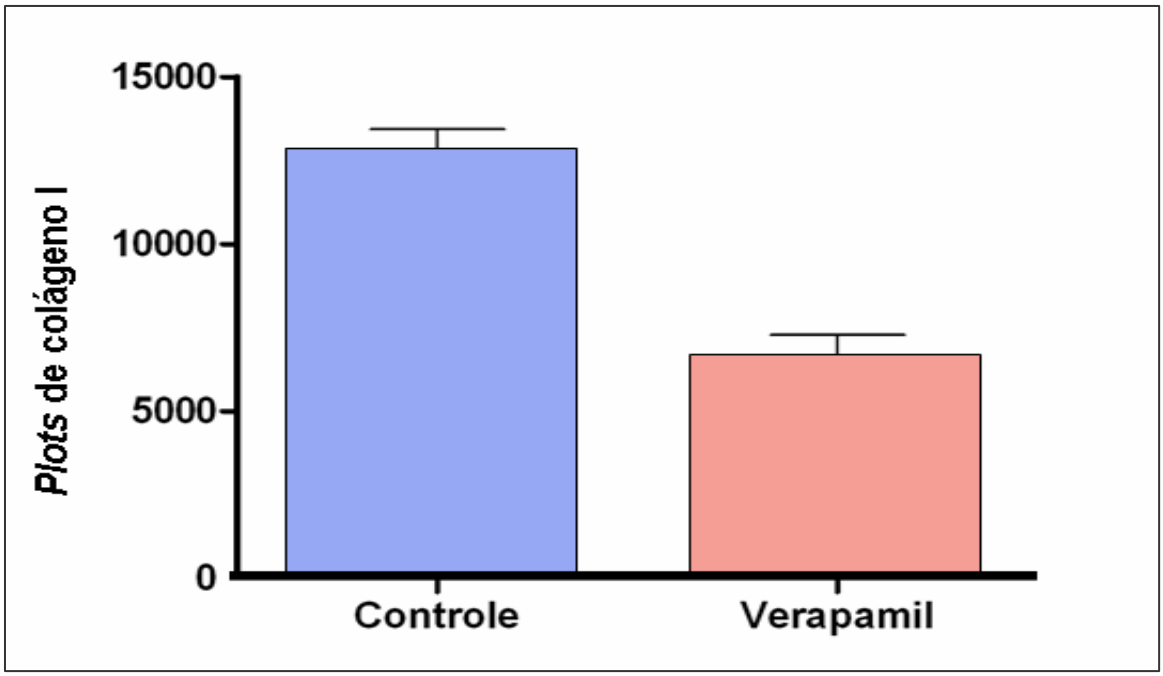

Figura 29 – *Immunoblot* do lisado de fibroblastos controles e tratados com verapamil evidenciando o efeito inibitório exercido pelo verapamil sobre a biossíntese de colágeno I ($p<0,05$)

4.10 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO VERAPAMIL SOBRE OS FIBROBLASTOS DÉRMICOS EM CULTURA 3D (GEL DE COLÁGENO)

4.10.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTRAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO

A remodelação é a fase da cicatrização mais importante para a cirurgia plástica, uma vez que, determina a aparência final da cicatriz. Para se analisar a capacidade de contração dos fibroblastos controles e tratados, um gel de colágeno foi utilizado. No presente estudo não foi observado nenhuma contração do gel sem células. O gel povoado por fibroblastos controles apresentou contração progressiva durante o intervalo de tempo estudado (48h). Após esse período não se observou qualquer alteração na área do gel. O gel povoado por fibroblastos tratados com

50 µM de verapamil apresentou uma contração progressiva menos intensa, quando comparada ao grupo controle no mesmo tempo. Os valores relativos à área dos géis em contração, povoados com fibroblastos controles e tratados, podem ser observadom na figura 31 e tabela 2. O perfil da contração dos géis gerado pelos fibroblastos controles e tratados, em relação à área original, pode ser bem caracterizado na figura 30.

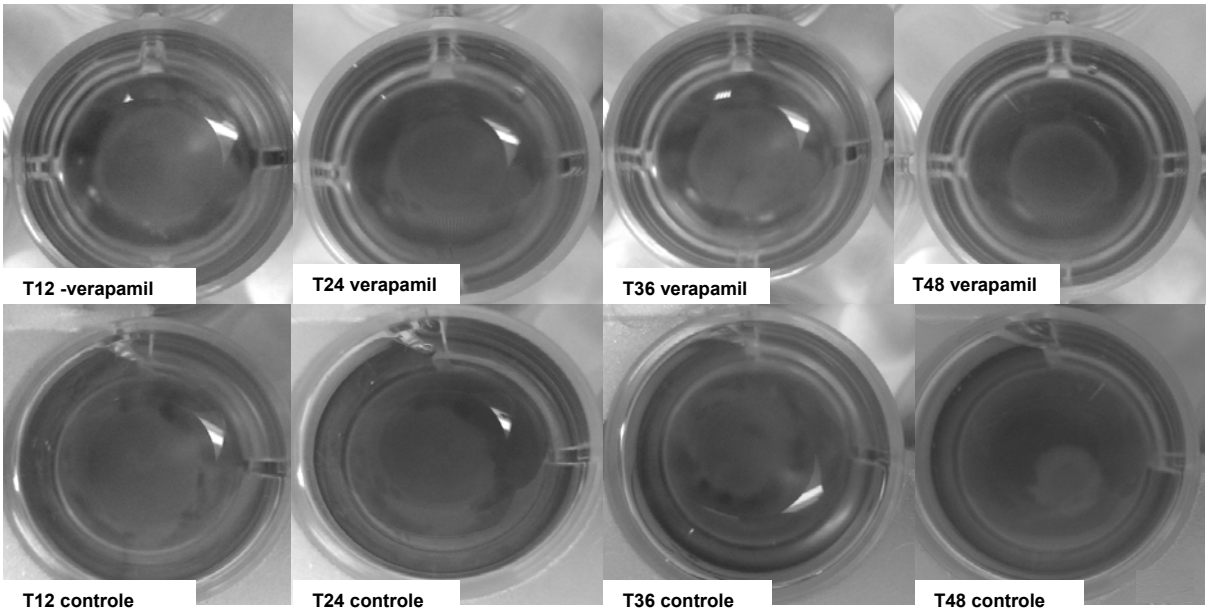

Figura 30 – Perfil da contração progressiva de géis de colágeno I povoados por fibroblastos controles e fibroblastos tratados com verapamil. Nota-se a contração mais importante dos géis povoados por fibroblastos controles, resultando em um gel, ao final das 48 horas de observação, com uma área cerca de 50% menor que a do gel povoado por fibroblastos tratados.

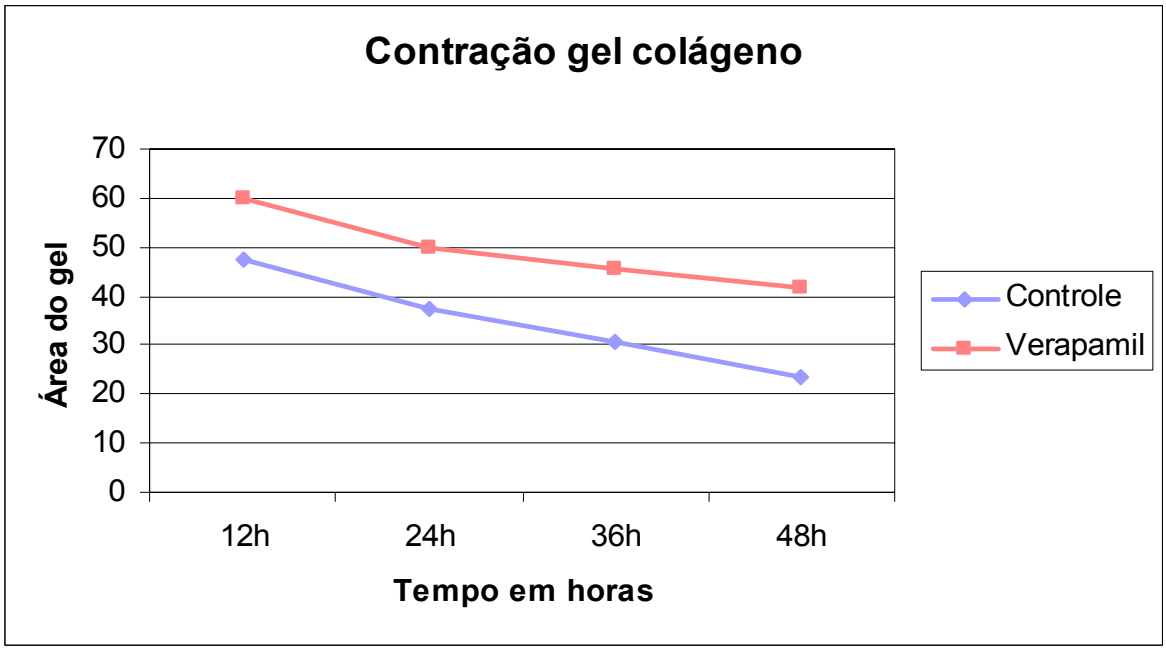

Figura 31 – Gráfico representando a porcentagem de contração do gel de colágeno povoado por fibroblastos controles e tratados durante 48 horas (p<0,0001).

Tabela 2 – Porcentagem de contração do gel nos grupos controle e tratados ao longo de 48 horas (p<0,0001).

Linhagem	12h	24h	36h	48h
Controle	**47,28**	**37,26**	**30,76**	**23,66**
Verapamil	**60,17**	**49,72**	**45,61**	**41,85**

4.10.2 ANÁLISE POR HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Fibroblastos controles e tratados povoados em gel de colágeno foram corados por HE e analisados ao microscópio (AxioVision Zeiss). As imagens do grupo controle evidenciaram a presença de fibroblastos com morfologias alongadas e arredondadas (Figura 32 A, B, C e D), ao passo que, as imagens do grupo tratado mostraram células predominantemente arredondadas (Figura 32 E, F, G e H).

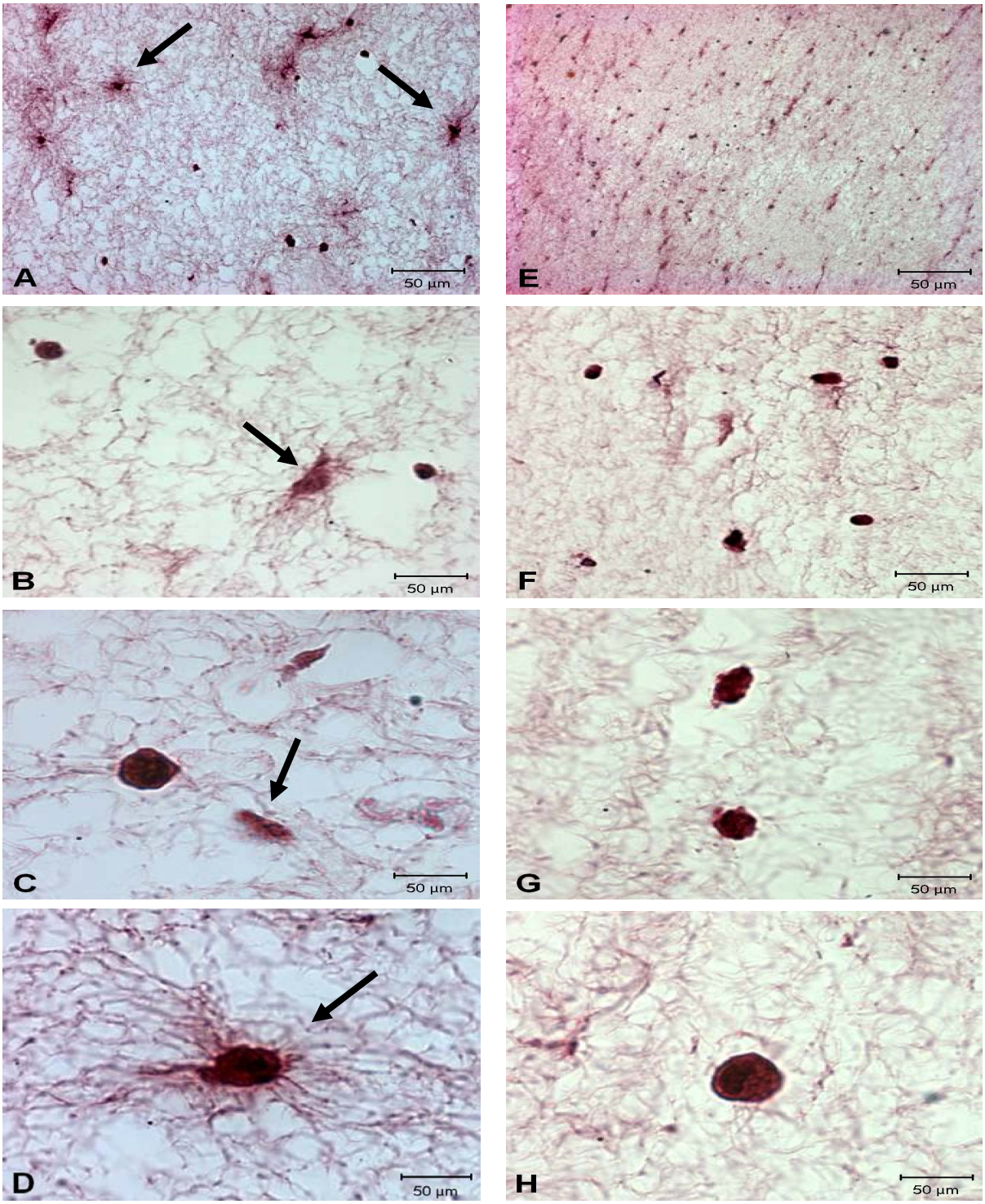

Figura 32 – Fotomicrografias obtidas ao microscópio (AxioVision Zeiss) Mostra fibroblastos controles e tratados, povoados em gel de colágeno, corados por HE. Nota-se no grupo controle a presença de células de morfologias fusiformes e arredondadas (A, B, C e D), enquanto que, as células do grupo tratado apresentam morfologia predominantemente arredondada. (E, F, G e H). Nota-se ainda, no grupo controle, um aumento proximal na densidade de fibrilas colágenas, imediatamente ao redor dos fibroblastos (setas).

4.10.3 ANÁLISE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os fibroblastos cultivados em monocamadas apresentam-se como células alongadas, fusiformes, com numerosas expansões citoplasmáticas e com os filamentos de actina dispostos paralelamente ao longo do maior eixo da célula fibras de estresse (Figuras 11 e 12). Nas culturas desenvolvidas em gel de colágeno, os fibroblastos exibem uma forma mais arredondada, possivelmente influenciada por uma interação entre a célula e a matriz extracelular espacialmente melhor distribuída. Quando os fibroblastos cultivados em gel de colágeno foram submetidos ao tratamento com verapamil, foi possível notar um reforço da coloração para actina na periferia do fibroblasto junto ao córtex celular, enquanto que, a região perinuclear mostrou-se mais fracamente corada (Figura 33).

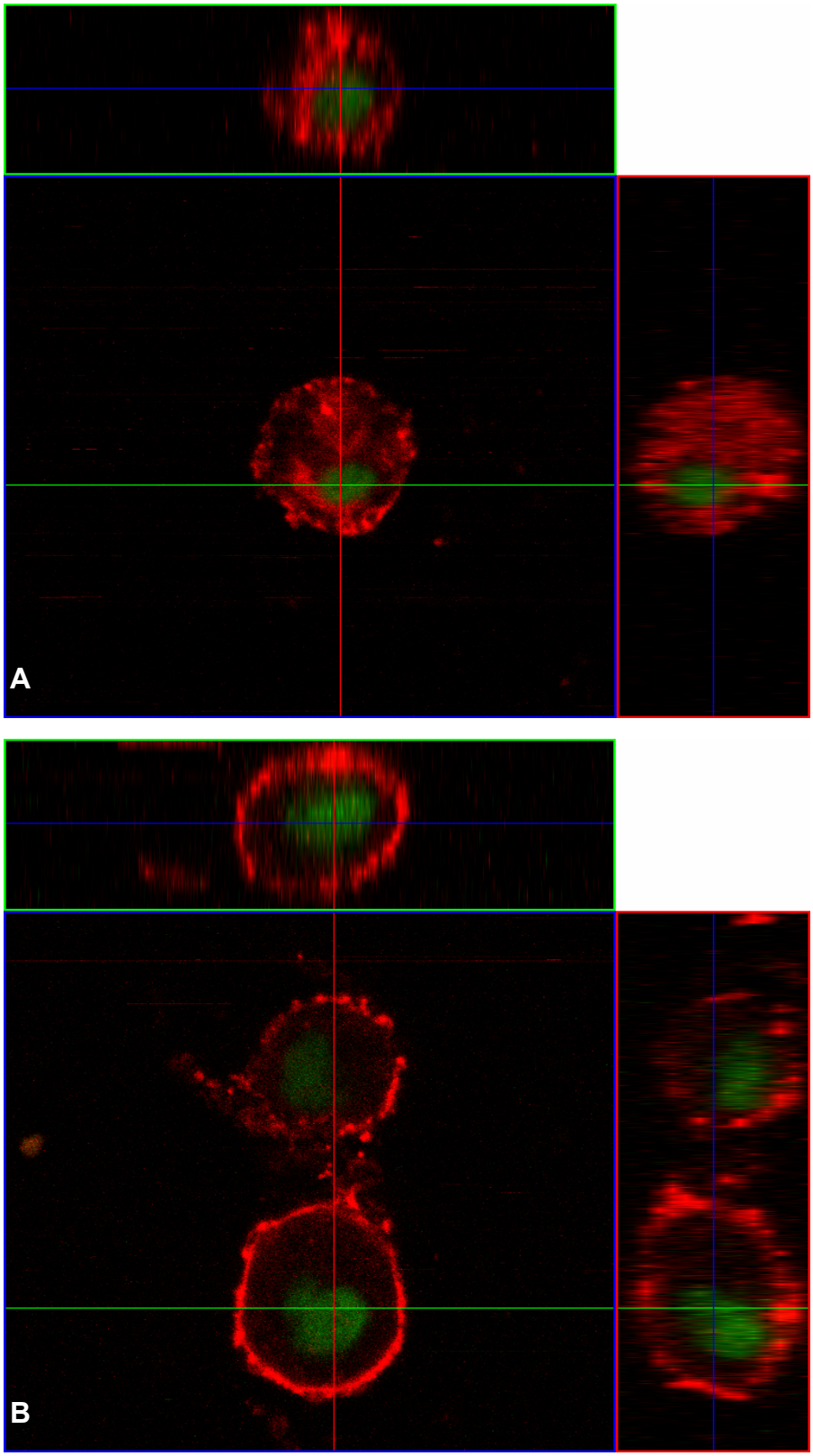

Figura 33 – Morfologia de fibroblastos dérmicos humanos povoados em gel de colágeno tipo I. Observa-se que os fibroblastos controle e tratados apresentam morfologia mais arredondada e que o fibroblasto controle apresenta marcação para actina mais homogeneamente distribuída (A), enquanto que, nos fibroblastos tratados, nota-se um reforço periférico, com a região perinuclear pouco corada (B).

5 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é um processo de reparo tecidual que envolve uma série de eventos biológicos, estando sujeito a inúmeras falhas em sua evolução. Apesar dos aprimoramentos no diagnóstico e na terapia das feridas, os insucessos na condução do processo cicatricial ainda têm sido grandes. Complicações como o não fechamento da ferida ou o aparecimento de contraturas, quelóides e cicatrizes hipertróficas, fazem do processo cicatricial, um problema de saúde pública, com grande impacto sobre os custos de assistência a saúde.

O tratamento dos chamados distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos (quelóides e cicatrizes hipertróficas), além de demorado, comporta poucas abordagens sistematicamente bem sucedidas. Nas ultimas décadas, muitos pesquisadores têm se dedicado a elaborar métodos terapêuticos que possam ser realmente eficazes na prevenção e tratamento destas patologias cicatriciais.

O verapamil, um bloqueador do canal de cálcio, tem sido recomendado no tratamento dos quelóides e cicatrizes hipertróficas devido sua capacidade de reequilibrar a biossíntese da matriz extracelular. Investigar os possíveis efeitos do verapamil quando aplicados em loco, nos quelóides e cicatrizes hipertróficas, torna-se extremamente relevante. Sendo assim, a determinação dos efeitos do verapamil sobre fibroblastos dérmicos humanos em cultura, bem como, sua influência sobre a homeostase da matriz extracelular foi o objetivo do presente estudo.

O enfoque inicial deste trabalho consistiu na análise das possíveis alterações morfológicas sofridas pelos fibroblastos quando incubados com o verapamil. A freqüência de 63% de fibroblastos arredondados/estrelados, encontrada no estudo, ficou um pouco abaixo da observada por Doong et al., em 1996 (74,8%). Esta

diferença pode ser conseqüência da maior concentração de verapamil (100 μM) utilizada pelos autores.

A observação, ao microscópio invertido de contraste de fase, de uma menor densidade de células nas culturas tratadas, sugeriu possível efeito inibitório da droga sobre a proliferação celular. Este dado pode ser confirmado pela curva de crescimento que evidenciou uma inibição da proliferação celular de 64,4%, após 48 horas de incubação com 50 μM de verapamil. Kang et al. (1997), demonstraram, através do método de hexosaminidase, que o verapamil, na concentração de 1000 e 100 μM, foi capaz de reduzir em 95% e 65%, respectivamente o índice de proliferação celular de fibroblastos da cápsula de Tenons de humanos em cultura. Em seus estudos, Giugliano et al. (2003), utilizando o ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], demonstraram uma redução de 26% na proliferação celular de fibroblastos derivados de quelóides incubados com 100 μM de verapamil. A análise da proliferação celular, no presente trabalho, foi complementada com a avaliação da freqüência de células na fase S do ciclo celular pela incorporação de BrdU. Os dados indicaram uma fração de células sintetizando DNA duas vezes maior no grupo controle, reforçando a idéia de que o verapamil exerce efeito inibitório sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos em cultura.

Kang et al., em 1997, após caracterização da influência do verapamil sobre a proliferação celular, estudaram os efeitos da droga sobre a viabilidade dos fibroblastos da cápsula de Tenons. Através da análise da freqüência de cariorrexis e de cariólise, os autores não observaram efeitos citotóxicos com doses inferiores a 100 μM. Quando 1000 μM de verapamil foram utilizados, os autores notaram a ocorrência de um grande índice de cariorrexis em todos os tempos estudados.

Faude et al., em 2000, demonstraram que células epiteliais pigmentares da retina de humanos em cultura, tratadas com 10 μM de verapamil, não apresentavam alterações morfológicas ou mudanças na capacidade de contração estatisticamente significativas. Para analisar o índice de apoptose em fibroblastos de quelóides incubados com 100 μM de verapamil, Giugliano et al., em 2003, utilizaram a reação com TUNEL. Após 96 horas de incubação, os autores observaram que os fibroblastos tratados apresentavam um índice de apoptose em torno de 8%, em comparação com o grupo controle, com índice em torno de 1%. Luan et al., em 2007, avaliaram o índice de apoptose de fibroblastos gengivais humanos normais na presença e na ausência de verapamil, por 18 horas. Utilizando o ensaio MTT os resultados mostraram 12,7% de apoptose no grupo controle, 20,9% no grupo tratado com 10 μM de verapamil e 24,3% nos fibroblastos tratados com 100 μM da droga.

Os experimentos utilizados no presente trabalho, na determinação do índice de proliferação celular e para análise da viabilidade celular, sugerem um efeito inibitório significativo do verapamil sobre a proliferação celular sem, no entanto, produzir efeitos citotóxicos importantes sobre os fibroblastos, nas concentrações empregadas.

Utilizando o método de exclusão de células inviáveis por azul de trypan foi observado neste estudo que, as células controles e tratadas com verapamil 50 μM apresentaram 92,31% e 91,01%, respectivamente, de viabilidade. Viabilidade esta, que analisada por fluorescência, foi de 98,3% no grupo controle e de 96,27% no grupo tratado.

Doong et al., em 1996, analisaram a ação do verapamil sobre os filamentos de actina e microtúbulos de fibroblastos de quelóides em cultura por

imunofluorescência. Os dados encontrados no presente trabalho, no que se refere ao padrão de organização destes filamentos, em fibroblastos dérmicos normais incubados com o verapamil, estão em concordância com as informações descritas por Doong. Complementando a análise da influência da droga sobre os elementos do citoesqueleto, foram avaliados neste estudo os filamentos intermediários e os contatos focais. A análise da vimentina ao microscópio confocal de varredura a laser evidenciou uma discreta alteração no seu padrão, passando o filamento a apresentar uma característica mais granular. Quando células tiveram a vinculina, uma proteína relacionada aos contatos focais, analisada por imunofluorescência, foi possível caracterizar no grupo controle a presença de inúmeros *spots* luminosos regularmente distribuídos por toda a célula, observação esta não repetida nas células tratadas com o verapamil. É possível que o verapamil, por alterar o padrão de organização da actina, acabe exercendo alguma influência sobre as relações do filamento com os contatos focais e destes, com a matriz extracelular.

Block et al., em 1989, demonstraram que, em culturas de células de músculos lisos (vasculares), o verapamil inibe a formação de trifosfato de inositol (IP^3), do diacilglicerol (DAG) e, conseqüentemente, o aumento da concentração do cálcio intracelular. Reduções na concentração citosólica do cálcio, segundo Doong et al. (1996), podem induzir a reorganização dos filamentos de actina e alterações morfológicas em fibroblastos de quelóides em cultura. Roth et al., em 1996, descreveram que a concentração intracelular do cálcio está intimamente relacionada a deposição de colágeno na matriz extracelular dependente de PDGF e Giugliano et al., em 2003, referiram que alterações na concentração do íon podem exercer influência sobre a sinalização celular, forma da célula, proliferação e interações dos fibroblastos com a matriz extracelular.

A concentração citosólica do cálcio foi avaliada no presente trabalho por imunofluorescência, após marcação com o *calcium green.* Os fibroblastos controles apresentaram-se como células de fluorescência intensa e homogênea, igualmente distribuída por todo o citoplasma, enquanto que, as células tratadas, de morfologia mais arredondada, apresentaram fluorescência reduzida e irregular. Estes dados confirmam a eficácia do verapamil no bloqueio dos canais de cálcio, reduzindo a concentração citosólica do íon e alterando a morfologia dos fibroblastos.

A partir da análise da dinâmica do cálcio, utilizando a ferramenta pseudo 3D do microscópio confocal, foi possível observar que as células controles apresentaram uma curva crescente de fluorescência ao longo do experimento, sendo seu valor máximo alcançado após 35 minutos de incubação com o *calcium green*, enquanto que, a fluorescência máxima só foi alcançado nas células tratadas após 45 minutos de incubação. Estes dados complementam as informações anteriores, relacionadas à morfologia celular e intensidade de fluorescência, além de permitir uma adequada caracterização da variação temporal da concentração citosólica do íon cálcio nos grupos de estudo.

As informações obtidas através da utilização do módulo pseudo 3D, foram suportadas por dois outros experimentos utilizando as ferramentas *profile* e *histogram* do microscópio confocal. Os dados obtidos por estes métodos fortaleceram as evidencias de uma maior fluorescência nas células controles, com valores máximos de intensidade alcançados mais precocemente, em comparação aos fibroblastos tratados.

Como possivelmente o verapamil, ao bloquear a entrada de cálcio nas células, reduz a concentração citosólica do referido íon e altera a morfologia celular,

fibroblastos em cultura foram incubados em meios com diferentes concentrações de cálcio, sendo para tanto, utilizados os meios MCDB e DMEM/EGTA. Após 48 horas de incubação, as células incubadas com os dois meios de cultura tornaram-se mais arredondadas, passando a apresentar morfologia similar aquela induzida pelo verapamil. Os resultados obtidos neste experimento reforçam a idéia da influência exercida pelo verapamil sobre homeostase do cálcio e na determinação da morfologia celular.

É possível que células específicas envolvidas na cicatrização respondam diferentemente as variações da concentração do cálcio. Sank et al., 1989, mostraram a inibição da adesão e da migração de queratinócitos por elevados níveis de cálcio *in vitro* e *in vivo*, sugerindo o uso do verapamil no manejo de feridas crônicas. Steinleitner et al., 1990, referiram que o verapamil, injetado intraperitonealmente na concentração de 2,5 mg/kg, em coelhos submetidos à histerectomia, reduzia significativamente o índice de formação de aderências intra-abdominais, provavelmente por modular a cicatrização e a regeneração peritoneal. Segundo Lee et. al., 1990, os bloqueadores do canal de cálcio podem ser eficazes no controle da secreção de glicosaminoglicanos e na redução da incorporação de proteínas a matriz extracelular.

Após ter sido realizada a análise da influência do verapamil sobre a morfologia, organização do citoesqueleto e concentração citosólica do cálcio em fibroblastos em cultura, foi estudada a ação da referida droga sobre a síntese das metaloproteinases (MMPs) e do colágeno e assim, por conseqüência, sobre a homeostase da matriz extracelular.

As metaloproteinases da matriz formam uma família de pelo menos 23 enzimas que possuem como características comuns a degradação de proteínas da matriz extracelular (NAGASE et al., 1999; CHANG et al., 2001; STERNLICHT et al., 2001). As metaloproteinases podem ser tanto expressas constitutivamente, como reguladas por numerosos fatores que podem ser estimuladores ou supressores. Esses fatores podem ser sinais derivados de integrinas, matriz extracelular, estresse celular e mudança na forma da célula (STERNLICHT et al., 2001).

Componentes da matriz extracelular possuem domínios crípticos, que são expostos por proteólise e induzem respostas biológicas (MALINDA et al., 1996; COLOGNATO et al.; 2000, MINER et al., 2004). Esses domínios crípticos são sítios funcionais que estão enterrados dentro da estrutura das macromoléculas da matriz extracelular e, portanto não estão expostos à superfície das proteínas. A ativação dos sítios crípticos da matriz extracelular exige modificação estrutural das moléculas e esta modificação pode ocorrer através da mudança conformacional ou processo proteolítico (SCHENK et al., 2003). Uma das primeiras publicações que relacionam mudanças na forma da célula com remodelação tecidual foi escrita por Dielgelmann et al., em 1972. Doong et al., em 1996, observaram que, após a incubação de fibroblastos de quelóides com 100 μM de verapamil, por 18 a 20 horas, 60% das células que haviam se tornado arredondadas apresentavam um aumento na síntese de procolagenase. Roth et al., em 1996, demonstraram que os bloqueadores do canal de cálcio, incubados com fibroblastos pulmonares humanos e com células musculares lisas vasculares, foram capazes de induzir a um aumento da atividade da MMP-2.

No presente trabalho a análise da síntese de metaloproteinases foi realizada por zimografia de caseína, pela análise da atividade da colagenase e por

immunoblot. A zimografia revelou bandas gelatinolíticas com peso correspondente ao da MMP-I, tendo a densitometria das bandas mostrado que o verapamil induziu um aumento significativo (10X) da atividade da MMP-I, quando comparada às células controles não tratadas. O ensaio de atividade da colagenase do meio condicionado demonstrou que o verapamil induziu a um aumento de 3x na produção de MMP-I. A análise por *immunoblot* da MMP-I no meio condicionado e no lisado de células, foi reativa somente para o grupo de células tratado com o verapamil. As diferenças nos resultados obtidos na análise das metaloproteinases podem ser devidas a sensibilidade de cada método utilizado. Os presentes resultados sugerem que o verapamil foi capaz de influenciar a biossíntese de MMP-I, aumentando a produção desta enzima e, potencialmente, a degradação da matriz extracelular. Aggeler et al., em 1984, sugeriram em seus estudos que os bloqueadores do canal de cálcio, ao induzirem alterações morfológicas em fibroblastos em cultura, promoveriam alterações na expressão gênica, estimulando um aumentando na síntese de colagenase e reduzindo, concomitantemente, a produção de proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e o colágeno.

Quelóides e cicatrizes hipertróficas são caracterizadas por uma produção excessiva de colágeno tipo I e III. A síntese de colágeno nos quelóides é 3X maior que nas cicatrizes hipertróficas e 20X maior que nas cicatrizes normais (ENGLISH et al., 1999). O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator-β transformador do crescimento (TGF- β) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), são fatores chaves na modulação dos fibroblastos e na produção da matriz extracelular. O verapamil reduz a produção destas citocinas *in vitro*, e consequentemente, o crescimento celular e a biossíntese da matriz (GIUGLIANO et al., 2003). Lee et al., 1990, utilizando fibroblastos bovinos em cultura, demonstraram

que o verapamil retarda a incorporação de prolina a matriz extracelular, quando utilizado na concentração de 100 μM.

A detecção de possíveis diferenças na quantidade de colágeno sintetizado por fibroblastos controles e tratados, no presente estudo, evidenciou, ao microscópio confocal de varredura a laser, que os fibroblastos controles apresentavam fluorescências para colágeno I e procolágeno I mais intensas, em relação aquelas emitidas pelos fibroblastos do grupo tratado com 50 μM de verapamil. Nos fibroblastos controles foi possível observar ainda, a presença de numerosos grânulos fluorescentes junto à membrana plasmática, os quais não puderam ser bem caracterizados nas células tratadas. Os dados obtidos por análise de fluorescência foram confirmados por *immunoblott,* que mostrou uma redução de cerca de 50% na quantidade de colágeno I no grupo tratado, sugerindo um possível efeito inibitório do verapamil sobre a biossíntese de colágeno.

Culturas em monocamada são comumente utilizadas em estudos científicos por sua simplicidade e praticidade. Várias tentativas têm sido feitas no sentido de estabelecer um sistema de cultura *in vitro* que mimetize as interações entre células e matriz extracelular, como ocorre *in vivo* (MAUCH et al., 1988). Há mais de 80 anos, Weiss (1959) mostrou que fibroblastos cultivados sobre substratos a base de plasma sangüíneo apresentavam variações morfológicas entre bipolar e estrelada, estando estas intimamente relacionadas com o padrão de organização da rede de fibras presente no substrato, enfatizando assim, a dinâmica das interações entre as células e o ambiente físico. O colágeno, o mais abundante componente da matriz extracelular, tem sido amplamente estudado por sua biocompatibilidade (KREWSON et al., 1994). Bell et al., 1979, descreveram *in vitro* um modelo de gel de colágeno que diminuía de diâmetro quando povoado por fibroblastos humanos. Os contatos

focais são estruturas que promovem a adesão entre células e substrato, transmitindo informações de maneira bidirecional entre moléculas extracelulares e o citoplasma (CUKIERMAN et al., 2001). As interações entre fibroblastos e matriz de colágeno causam mudanças nas propriedades da matriz e nas atividades celulares. Essas mudanças são estimuladas normalmente por alterações locais e globais. Dentre as alterações locais, destaca-se o aumento proximal na densidade de fibrilas colágenas, imediatamente ao redor dos fibroblastos, com a capacidade de ativar proteínas de contração, como as encontradas nos tecidos maduros. Em relação as alterações globais, destaca-se o aumento na densidade da matriz resultando em uma correspondente diminuição do volume da mesma, freqüentemente referida como contração (GRINNELL, 2003). No presente trabalho, a análise de géis de colágeno povoados por fibroblastos dérmicos humanos e corados por hematoxilina-eosina (HE), mostrou no grupo controle a presença de células de morfologias tanto fusiformes, quanto arredondadas, enquanto que, as células do grupo tratado apresentaram-se com morfologia predominantemente arredondada. Foi possível notar ainda, no grupo controle, um aumento proximal na densidade de fibrilas colágenas, imediatamente ao redor dos fibroblastos, sugerindo uma íntima interação entre células e substrato. No grupo tratado, possivelmente, com o arredondamento das células, induzido pelo verapamil, essa interação foi minimizada, contribuindo desta maneira para a redução na capacidade de contração do gel pelos fibroblastos.

Faude et al., em 2000, relataram que a proteino-quinase C, uma enzima ativada a partir da hidrólise do fosfatidil inositol, está relacionada a transmissão de uma série de informações enviadas através da membrana citoplasmática, dependentes de processos regulados pelo cálcio. A ativação da proteíno-quinase C estimularia os fibroblastos a contraírem o gel de colágeno. A proteíno-quinase C,

provavelmente, atua também, de maneira indireta, no controle da síntese de fatores de crescimento como o TGF-β, os quais atuam estimulando a contração do gel. Goto et al., em 1998, demonstraram que reduções na concentração citoplasmática de cálcio podem inibir a endotelina-I, um modulador endógeno da contração de miofibroblastos ou de *fibroblast- like cells*.

Complementando o estudo realizado com hematoxilina-eosina, foi realizada a análise quantitativa da contração de géis de colágeno promovida por fibroblastos controles e tratados. O modelo descrito por Bell et al., em 1979, tem sido aceito na literatura como adequado para o estudo da contração de feridas, uma vez que, inclui dois dos principais participantes dérmicos envolvidos na formação da cicatriz: a matriz extracelular e os fibroblastos. A contração dos géis povoados por fibroblastos controles foi progressivamente mais importante nos tempos estudados, resultando em géis com áreas finais 50% menores, quando comparadas as áreas dos géis povoados por fibroblastos tratados com 50 μM de verapamil. É possível que o verapamil, ao alterar a morfologia dos fibroblastos, exerça influência sobre as relações das células com o substrato, interferindo desta maneira na contração do gel de colágeno. Kamamoto et al., em 2003, observaram que fibroblastos de quelóides povoados em gel de colágeno promoveram a contração do gel de maneira mais eficaz que os fibroblastos de pele normal, sugerindo que, possivelmente, este dado possa estar envolvido na formação de cicatrizes inestéticas.

Os fibroblastos controles povoados em gel de colágeno, ao serem analisados ao microscópio confocal de varredura a laser, apresentaram marcação para F-actina mais homogeneamente distribuída pela célula, enquanto que, nos fibroblastos tratados, essa marcação só pode ser adequadamente observada na periferia da célula. Estes dados sugerem que o verapamil possa alterar o padrão de organização

dos microfilamentos de fibroblastos em gel de colágeno, com manutenção das fibras de estresse junto ao córtex celular, como observado nas células tratadas em monocamada.

A dificuldade no tratamento das cicatrizes hipertróficas e dos quelóides resulta da complexidade da biologia celular e molecular das próprias lesões. Uma maior compreensão a esse nível resultará na elaboração de novas condutas preventivas e de novos métodos terapêuticos. A regulação dos fatores de crescimento, a modulação do processo inflamatório e da resposta imunológica, além do equilíbrio na síntese de proteínas e de enzimas proteolíticas, mostram-se essenciais no controle dos distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos. O presente estudo discutiu a influência do verapamil sobre a homeostase do cálcio e sobre as reações intra e extracelulares mediadas por este íon, contribuindo desta maneira, sensivelmente, no o entendimento de seus efeitos sobre a cicatrização e, conseqüentemente, sobre os distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados dos experimentos foi possível concluir que, o verapamil, ao ser incubado com fibroblastos dérmicos humanos:

1 – Inibiu a proliferação de fibroblastos, sem alterar significativamente sua viabilidade, quando utilizado na concentração de 50 μM.

2 – Alterou a morfologia dos fibroblastos para arredondados/estrelados.

3 – Promoveu a reorganização do citoesqueleto, predominantemente à custa dos filamentos de actina.

4 – Induziu a redução da concentração citosólica do íon cálcio.

5 – Estimulou a secreção de MMP-I.

6 – Reduziu a quantidade de procolágeno e colágeno I secretados.

7 – Inibiu a contração do gel de colágeno povoado por fibroblastos.

A análise das conclusões pontuais indica o potencial do verapamil no controle da biossíntese e degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, na prevenção e tratamento dos distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos. A determinação dos mecanismos moleculares envolvidos nas principais alterações induzidas pelo verapamil faz-se determinante para o melhor entendimento dos efeitos da droga na biologia dos fibroblastos e da cicatrização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERGEL, R.P.; PIZZURO, D.; MEEKER, C.A; LASK, G.; MATSUOKA, L.Y.; MINOR, R.R; CHU, M-L.; UITTO, J. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloids fibroblasts cultures. **J. Invest. Dermatol.**, v.84, n.5, p.384-390, 1985.

ABERNETHY, D.R.; SOLDATOV, N.M. Structure-functional diversity of human L-type Ca2+ channel: perspectives for new pharmacological targets. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.300, n.3, p.724-728, 2002.

AGGELER, J.; FRISH, S.M.; WERB, Z. Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblast. **J. Cell. Biol.**, v.98, p.1662-1671, 1984.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. New York: Garland Publishing, 2004.

AKASAKA, Y.; ONO, I.; YAMASHITA, T.; ISHII, T. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds**. J. Pathol.**, v.203, n.2, p.710-720, 2004.

ARORA, P.D.; BIBBY, K.J.; McCULLOCH, C.A. Slow oscillations of free intracellular calcium ion concentration in human fibroblasts responding to mechanical stretch. **J. Cell. Physiol.**, v.161, n.2, p.187-200, 1994.

BAYLEY, S.A.; REES, D.A. Analysis of the proteins, glycoproteins and glycosaminoglycans of fibroblast adhesions to substratum. **Biochim. Biophys. Acta**, v.689, n.2, p.351-362, 1982.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol. Surg.**, v.31, n.6, p.674-686, 2005.

BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potencial in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.76, n.3, p.1274-1278, 1979.

BERMAN, B.; BIELEY, H.C. Keloids. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.33, n.1, p.117-123, 1995.

BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v.361, n.6410, p.315-325, 1993.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.4, n.7, p.517-529, 2003.

BLOCK, L.H.; EMMONS, L.R.; VOGT, E.; SACHINIDIS, A.; VETTER, W.; HOPPE, J. Ca2+-channel blockers inhibit the action of recombinant platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. **Proc Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.86, n.7, p.2388-2392, 1989.

BONADONNA, G.; LECHI, C.; CORRADINI, P.; SINIGAGLIA, D.; DE TOGNI, P.; MIROSLAWA. Verapamil inhibits platelet aggregation by a calcium-independent mechanism. **Thromb. Haemost.**, v.56, n.3, p.308-410, 1986.

BRADDOCK, M. Wound repair in skin and bone. **Science**, v.8, n.4, p.218-229, 2002.

BURCHIEL, S.W.; EDWARDS, B.S.; KUCKUCK, F.W.; LAUER, F.T.; PROSSNITZ, E.R.; RANSOM, J.T.; SKLAR, L.A. Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacologic applications. **Methods**, v.21, n.3, p.221-230, 2000.

CARREL, A.; BURROWS, M.T. Cultivation of tissues in vitro and its technique **J. Exp. Med.**, v.13, p.387-396, 1911.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell. Biol.**, v.11, n.11, p.37-43, 2001.

CHO, M.R.; MARLER, J.P.; THATTE, H.S.; GOLAN, D.E. Control of calcium entry in human fibroblasts by frequency-dependent electrical stimulation. **Front. Biosci.,** v.1, n.7, p.1-8, 2002.

CHODOROWSKA, G.; ROGUS-SKORUPSKA, D. Cutaneous wound healing. **Ann. Univ Mariae Curie Sklodowka**, v.59, n.2, p.403-407, 2004.

CHOWDRI, N.A.; MATTO, M.M.A.; DARZI, M.A. Keloids and hypertrophic scars: results with intra-operative and serial postoperative corticosteroid injection therapy. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v.69, n.9, p.655-659, 1999.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev. Dyn.**, v.218, n.2, p.213-234, 2000.

CONSTANTIN, C.C.; SIMON, M. Phenotypic differences between dermal fibroblasts from different body sites determine their responses to tension and TGFβI. **BMC Dermatol.**, v.2, n.13, p.1-13, 2002.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D.R.; YAMADA, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v.294, p.1708-1712, 2001.

D`ANDREA, F.; BRONGO, S.; FERRARO, G.; BARONI, A. Prevention and treatment of keloids with intralesional verapamil. **Dermatology**, v.204, p.60-62, 2002.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. α-Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab. Invest.**, v. 63, p.21-29, 1990.

DEVLIN-ROONEY, K.; JAMES, W. Management and prevention of abnormal scars. **Nurs. Stand.**, v.19, p.45-54, 2005.

DESMOULIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scars. **Am. J. Pathol.**, v.146, p.56-66, 1995.

DIEGELMANN, R.F.; PETERKOFSKY, B. Inhibition of collagen secretion from cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v.69, p.892-896, 1972.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosc**., v.9, p.283-289, 2004.

DOLBEARE, F.; BEISKER, W.; PALLAVICINI, M.G.; VANDERLAAN, M.; GRAY, J.W. Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis: stoichiometry and sensitivity. **Cytometry**, v.6, n.6, p.521-530, 1985.

DOONG, H.; DISSANAYAKE, S.; GOWRISHANKAR, T.R.; LA BARBERA, M.C.; LEE, R.C. The 1996 Lindeberg Award. Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts. **J. Burn. Care Rheabil**., v.17, p.497-514, 1996.

DOYLE-LLOYD, D.J.; WHITE, J.A. Keloid. **J. State Med. Soc.**, v.143, n.12, p.9-12, 1991.

ELLITSGAARD, V.; ELLITSGAARD, N. Hypertrophic scars and keloids: a recurrent problem revisited. **Acta Chir Plast.**, v.39, n.3, p.69-77, 1997.

ENGLISH, R.S.; SHENEFELT, P.D. Keloids and hypertrophic scars. **Dermatol. Surg.**, v.25, n.8, p.631-638, 1999.

EHRLICH, H.P.; DESMOULIÈRE, A.; DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K.; COMPTON, C.C.; GARNER, W,L,; KAPANCI, Y.; GABBIANI, G. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. **Am. J. Pathol.**, v.145, n.1, p.105-113, 1994.

ELLITSGAARD, V.; ELLITSGAARD, N. Hypertrophic scars and keloids: a recurrent problem revisited. **Acta Chir. Plast.**, v.39, n.3, p.69-77, 1997.

ESPAÑA, A.; SOLANO, T.; QUINTANILLA, E. Bleomicin in the treatment of keloid and hypertrophic scars by multiple needle punctures. **Dermatol. Surg.**, v.27, n.1, p.23-27, 2001.

EVANGELIO, J.A.; ABAL, M.; BARASOAIN,I.; SOUTO, A.A.; LILLO, M.P.; ACUÑA, A.U.; AMAT-GUERRI, F. Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. **Cell. Motil. Cytoskeleton**, v.39, n.1, p.73-90, 1998.

FALANGA, V.; ZITELLI, J.A.; EAGLSTEIN, W.H. Wound healing. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.19, p.559-563, 1988.

FAUDE, F.; ENZMANN, V.; POSCHMANN, E.; HOFFMANN, S.; WIEDEMANN, P. R-(+)-verapamil, S-(-)-verapamil and racemic verapamil inhibit human retinal pigment epithelial cell contraction. **Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v.238, p.537-541, 2000.

FLECKENSTEIN, A.; KAMMERMEIER, H.; DÖRING, H.J.; FREUND, H.J. On the method of action of new types of coronary dilatators with simultaneous oxygen-saving myocardial effects, prenylamine and iproveratril. **Z. Kreislaufforsch**, v.56, n.8, p.839-858, 1967.

FLECKENSTEIN, A. History of calcium antagonists. **Circ. Res.**, v.52, n.2, pt.2, p.3-16, 1983.

FIETZEK, P.P.; KHÜN, K. The primary structure of collagen. **Int. Rev. Connect. Tissue Res.**, v.7, p.1-60, 1976.

FURTHMAYR, H.; TIMPL, R. Immunochemistry of collagens and procollagens. **Int. Rev. Connect. Tissue Res.**, v.7, p. 61-99, 1976.

GILMAN, A.G. **The Pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw Hill, 1996.

GIUGLIANO, G.; PASQUALI, D.; NOTARO, A.; BRONGO, S.; D`ANDREA, F.; BELLASTELLA, A.; SINISI, A.A. Verapamil inhibits interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production in primary cultures of keloid fibroblasts. **Br. J. Plast. Surg.**, v.56, n.8, p.804-809, 2003.

GLUSA, E. Effect of verapamil on platelet aggregation. **Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.**, v.115, n.4, p.469-473, 1988.

GOLD, M.H.; FOSTER, T.D.; ADAIR, M.A.; BURLISON, K.; LEWIS, T. Prevention of hypertrophic scars and keloids by the prophylactic use of topical silicone gel sheets following a surgical procedure in an office setting. **Dermatol. Surg.**, v.27, n.7, p.641-644, 2001.

GOLDSTEIN, L.S.; VALE, R.D. Cell biology. New cytoskeletal liaisons, **Nature**, v.359, n.6392, p.193-194, 1992.

GOTO, T.; YANAGA, F.; OHTSUKI, I. Studies on the endothelin-I-induced contraction of rat granulation tissue pouch mediated by miofibroblasts. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1405, p.55-66, 1998.

GRINNEL, F. Fibronectin and wound healing. **Am. J. Dermatopathol**., v.4, p.185-192, 1982.

GRINNEL, F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. **J. Cell. Biol.**, v.124, p. 401-404, 1994.

GRINNEL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends Cell. Biol.**, v.13, p.264-269, 2003.

HE, C.S.; WILHELM, S.M.; PENTLAND, A.P.; MARMER, B.L.; GRANT, G.A.; EISEN, A.Z.; GOLDBERG, G.I. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. **Pro. Natl. Acad. sci. USA.**, v.86, n.8, p.2632-2636, 1989.

HIRATA, H.; TATSUMI, H.; SOKABE, M. Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1770, n.8, p.1115-1127, 2007.

HOFFMAN, S.; GOPALAKRISHNA, R.; GUNDIMEDA, U.; MURATA, T.; SPEE, C.; RYAN, S.J.; HINTON, D.R. Verapamil inhibits proliferation, migration and protein

kinase C activity in human retinal pigment epithelial cells. **Exp. Eye Res.**, v.67, n.1, p.45-52, 1998.

JONE, S.W. Overview of voltage-dependent calcium channels. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 30, n.4, p.299-312, 1998.

K, K.S.; ARORA, P.D.; McCULLOCH, A.G. Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. **J. Biol. Chem**., v.276, n.38, p.35967-35977, 2001.

KAMAMOTO, F.; PAGGIARO, A.O.; RODAS, A.; HERSON, M.R.; MATHOR, M.B.; FERREIRA, M.C. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. **Artif. Organs**, v.27, n.8, p.701-705, 2003.

KANG, Y.; LEE, D.A.; HIGGINBOTHAM, E.J. In vitro evaluation of antiproliferative potential of calcium channel blockers in human Tenon's fibroblasts. **Exp. Eye Res.**, v.64, n.6, p.913-925, 1997.

KESSLER, D.; DETHLEFSEN, S.; HAASE, I.; PLOMANN, M.; HIRCHE F.; KRIEG, T., ECKES, B. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.39, p.36575-36585, 2001.

KNÄUPER, V.; WILL, H.; LOPEZ-OTIN, C.; SMITH, B.; ATKINSON, S.J.; STANTON, H.; HEMBRY, R.M. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.29, p.17124-17131, 1996.

KREWSON, C.E.; CHUNG, S.W.; DAÍ, W.; SALTZMAN, W.M. Cell aggregation and neurite growth in gels of extracellular matrix molecules. **Biotechnol. Bioeng.**, v.43, p.555-562, 1994.

KÜHN, K. Structure and biochemistry of collagen. **Aesth. Plast. Surg.**, v.9, p.141-144, 1985.

LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. **Gen. Physiol. Biophys.**, p.1-78, 2005. Suppl. 1.

LÄUGER, P. Dynamics of ion transport systems in membranes. **Physiol. Rev.**, v.67, n.4, p.1296-1331, 1987.

LAWRENCE, J.C. The aetiology of scars. **Burns Incl. Therm. Inj.**, v.13, 1987. Suppl. 3

LAWRENCE, W.T. Treatment of ear lobe keloids with surgery plus adjuvant intralesional verapamil and pressure earrings. **Ann. Plast. Surg.**, v.37, n.2, p.167-169, 1996.

LEBWOHL, M. From the literature : Intralesional 5-fluorouracil in the treatment of hypertrophic scars and keloids : clinical experience. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.42, n.4, p.677, 2000.

LEE, R.C.; DOONG, H.; JELLEMA, A.F. The response of burns scars to intralesional verapamil. Report of five cases. **Arch. Surg.**, v.129, n.1, p.107-111, 1994.

LEE, R.C.; PING, J.A. Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. **J. Surg. Res.**, v.49, n.5, p.463-466, 1990.

LEE, Y.; MINN, K.W.; BAEK, R.M.; HONG, J.J. A new surgical treatment of keloid: keloid core excision. **Ann. Plast. Surg**., v.46, n.2, p.135-140, 2001.

LINARES, H.A.; LARSON, D.L. Proteoglycans and collagenase in hypertrophic scar formation. **Plast. Reconstr. Surg**., v.62, p.589, 1978.

LUAN, Q.X.; CAO, C.F. Effect of verapamil on the proliferation of normal gingival fibroblast. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v.42, n.1, p.31-33, 2007.

MALINDA, K.M.; KLEINMAN, H.K. The laminins. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.28, n.9, p.957-959, 1996.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. **Histochem. Cell Biol.**, v.115, p.403-411, 2001.

MANETTI, R.; CECCARINI, C.; GUAZZI, G.; FEDERICO, A.; TIEZZI, A.; BUGNOLI, M.; CECCARINI, F.C. Characterization of the intermediate filament apparatus in skin fibroblasts from patients with giant axonal neuropathy: effect of trypsin. **Cell. Motil. Cytoskeleton**, v.8, n.1, p.55-60, 1987.

MANUSKIATTI, W.; FITZPATRICK, R.E.; GOLDMAN, M.P. Energy density and numbers of treatment effect response of keloidal and hypertrophic sternotomy scars to the 585-nm flashlamp-pumped pelsed-dye laser. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.45, n.4, p.557-565, 2001.

MARKS, A.R. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. **Am. J. Physiol**., v.272, n.2, p.597-605, 1997.

MAUCH, C.; HATAMOCHI, A.; SCHARFFETTER, K.; KRIEG, T. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. **Exp. Cell. Res.**, v.178, n.2, p.493-503, 1988.

McCARTHY, J.G. **Plastic Surgery**. Philadelphia: Saunders, 1990.

MERCIER, L.; LECHAIRE, J.P.; DESMOULIERE, A.; GAILL, F.; AUMAILLEY, M. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. **Exp. Cell Res.**, v.225, n.2, p.245-56, 1996.

MINER, J.H.; YURCHENCO, P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.20, p.255-284, 2004.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F., JR. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.

NIESSEN, F.B.; SPAUWEN, P.H.M.; SCHALKWIJK, J. KON, M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.104, n.5, p.1435-1458, 1999.

NOVÁKOVÁ, M.; DRÁBEROVÁ, E.; SCHÜRMANN, W.; CZIHAK, G.; VIKLICKY, V.; DR-ABER, P. gamma-Tubulin redistribution in taxol-treated mitotic cells probed by monoclonal antibodies. **Cell. Motil. Cytoskeleton**, v.33, n.1, p.38-51, 1996.

OKU, T.; TAKIGAWA, M.; YAMADA, M. Cell proliferation kinetics of cultured human keratinocytes and fibroblasts measured using a monoclonal antibody. **Br. J. Dermatol.**, v.116, n.5, p.673-679, 1987.

PENA, S.D.; OPAS, M.; TURKSEN, K.; KALNINS, V.I.; CARPENTER, S. Immunocytochemical studies of intermediate filament aggregates and their relationship to microtubules in cultured skin fibroblasts from patients with giant axonal neuropathy. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.31, n.2, p.227-234, 1983.

PETERSEN, M.J.; WOODLEY, D.T.; STRICKLIN, G.P.; O`KEEFE, E.J. Productiom of procollagenase by cultured human keratinocytes. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.2, p.835-840, 1987.

PORTER, G.A.; MAKUCK, R.F.; RIVKEES, S.A. Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.32, p.28942-28947, 2002.

PRICE, R.D.; MYERS, S.; LEIGH, I.M.; NAVSARIA, H.A. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v.6, n.6, p.393-402, 2005.

PRISANT, L.M. Verapamil revisited: a transition in novel drug delivery systems and outcomes. **Heart Dis.**, v.3, n.1, p.55-62, 2001.

RAMAKRISHNAN, K.M.; THOMA, K.P.; SUNDARARAJAN, C.R. Study of 1000 patients with keloids in South Índia. **Plast. Reconst. Surg.** v.51, n.3, p.276-280, 1974.

RAYAN, G.M.; PARIZZI, M.; TOMASEK, J.J. Pharmacologic regulation of Dupuytren's fibroblast contraction in vitro. **J. Hand Surg.**, v.21, n.6, p.1065-1070, 1996.

RIZZO, S.; SILVOTTI, M.G.; MARTANO, F. Growth curves: a method of monitoring established long-term primary human tumor cell cultures for autologous immunotherapy. **Anticancer Res.**, v.18, n.1, p.433-4369, 1998.

ROTH, M.; EICKELBERG, O.; KOHLER, E.; BLOCK, L.H. Ca2+ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, n.11, p.5478-5482, 1996.

ROWE, D.W.; MOEN, R.C.; DAVIDSON, J.M.; BYERS, P.H.; BORNSTEIN, P.; PALMITER, R.D. Correlation of procollagen m RNA levels in normal and transformed chick embryo fibroblasts with different rates of procollagen synthesis. **Biochemistry**, v.17, p.1581-1590, 1978.

RUSSELL, J.D.; WITT, W.S. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue, **Plast. Reconstr. Surg.**, v.57, p.207-212, 1976.

SANK, A.; CHI, M.; SHIMA, T.; REICH, R.; MARTIN, G.R. Increased calcium levels alter cellular and molecular events in wound healing. **Surgery**, v.106, n.6, p.1141-1147, 1989.

SCHATZMANN, H.J. The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. **Annu. Rev. Physiol.**, v.51, p.473-485, 1989.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. **Trends. Cell. Biol.**, v.13, n.7, p.366-375.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T.A.; GABBIANI, G. The miofibroblasto. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.22, n.2, p.141-147, 1998.

SOLDATOV, N.M. Molecular diversity of L-type Ca2+ channel transcripts in human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.89, n.10, p.4628-4632, 1992.

SONOHARA, S.; BRENTANI, R.R.; ANDRADE, H.F.Jr.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Procollagen biosynthesis and processing in guinea pig fibroblast culture medium. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.14, p.267-276, 1981.

STANLEY, A.C.; PARK, H.Y.; PHILLIPS, T.J.; RUSSAKOVSKY, V.; MENZOIAN, J.O. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. **J. Vasc. Surg.**, v.26, n.6, p.994-999, 1997.

STEED, D.L. The role of growth factors in wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v.77, n.3, p.575-586, 1997.

STEINLEITNER, A.; LAMBERT, H.; KAZENSKY, C.; SNACHES, I.; SUELDO, C. Reduction of primary postoperative adhesion formation under calcium channel blockade in the rabbit. **J. Surg. Res.**, v.48, n.1, p.42-45, 1990.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.17, p.463-516, 2001.

TREDGET, E.E.; NEDELEC, B.; SCOTT, P.G.; GHAHARY, A. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. **Surg. Clin. North. Am.**, v.77, n.3, p.701-730, 1997.

TRIGGLE, D.J. Calcium antagonists. History and perspective. **Stroke**, v.21, n.12, p.49-58, 1990.

TSIEN, R.W.; ELLINOR, P.T.; HORNER, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.12, n.9, p.349-354, 1991.

TUAN, T.L.; SONG, A.; CHANG, S.; YOUNAI, S.; NIMNI, M.E. In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. **Exp. Cell. Res.**, v.25, n.1, p.127-134, 1996.

UEDA, K.; FURUYA, E.; YASUDA, Y.; OBA, S.; TAJIMA, S. Keloids have continuous high metabolic activity. **Plast. Reconst. Surg.**, v.104, n.3, p.694-8., 1999.

VAN FURTH, R.; VAN ZWET, T.L. Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells. **J. Immunol. Methods**, v.108, n.2, p.45-51, 1988.

VIENNET, C.; BRIDE, J.; GABIOT, A.C.; HUMBERT, P. Comparison of different wound dressings on cultured human fibroblasts and collagen lattices. **J. Wound Care**, v.12, n.10, p.385-390, 2003.

VON DER MARK, K. Localization of collagen types in tissues. **Int. Rev. Connect. Tissue Res.**, v.9, p.265-324, 1981.

VOINCHET, V.; VASSEUR, P.; KERN, J. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v.7, n.6, p.353-357, 2006.

VOLBERG, T.; GEIGER, B.; KARTENBECK, J.; FRANKE, W.W. Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca^{2+} ions. **J.Cell.Biol.**, v.102, p.1832-1842, 1986.

WANG, Z.; FONG, K.D.; PHAN, T.T.; LIM, I.J.; LONGAKER, M.T.; YANG, G.P. Increased transcriptional response to mechanical strain in keloid fibroblasts due to increased focal adhesion complex formation. **J. Cell Physiol.**, v.206, n.2, p.510-517, 2006.

WEISS, P. Cellular dynamics. **Rev. Mod. Phys.** v.31, p.11-20, 1959.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, n.5, p.998-1008, 2007.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v.77, n.3, p.509-528, 1997.

YAMADA, Y.; FURUI, H.; FURUMICHI, T.; SUZUKI, T.; YAMAUCHI, K.; YOKOTA, M.; HAYASHI, H.; SAITO, H. Inhibitory effects of endothelial cells and calcium channel blockers on platelet aggregation. **Jpn. Heart J.**, v.31, n.2, p.201-215, 1990.