

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA COLOMBO TIVERON

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO *IN SITU* DE
RNAm PARA CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO
EM QUELOIDES E CICATRIZES NORMAIS**

Uberaba-MG

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

T544a Tiveron, Luciana Rodrigues da Cunha Colombo
Análise comparativa da expressão *in situ* de RNAm para citocinas e
fatores de crescimento em queloides e cicatrizes normais / Luciana
Rodrigues da Cunha Colombo Tiveron. -- 2018.
87 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Fede-
ral do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientador: Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. Pele. 2. Queloides. 2. Cicatrização. 3. Citocinas. I. Rodrigues Júnior,
Virmondes. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.5

2018

LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA COLOMBO TIVERON

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO *IN SITU* DE RNAm PARA
CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO EM QUELOIDES E CICATRIZES
NORMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Jr

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Uberaba-MG

2018

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO *IN SITU* DE RNAm PARA
CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO EM QUELOIDES E CICATRIZES
NORMAIS**

AUTORA: LUCIANA RODRIGUES DA CUNHA COLOMBO TIVERON

ORIENTADOR: PROF. DR. VIRMONDES RODRIGUES JÚNIOR

GRAU: MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências da Saúde,
área de concentração Patologia Humana da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

DATA DA DEFESA: 26/06/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marco Túlio Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Antônio Roberto Bozola
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Rogério, pelo apoio constante,
pela paciência e por ser o meu melhor exemplo,
minha base e meu alicerce.

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Elizete, pela
oportunidade de vida, pela dedicação diária e pela
crença em minha evolução.

*“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Rogério, pelo extremo carinho, companheirismo, amizade e amor, sentimentos fundamentais para todo e qualquer trabalho.

À amiga Isabela, que tornou esse trabalho mais leve e possível. Pessoa humilde, que não mede esforços para ajudar a todos que precisam. Solidária e companheira.

Ao meu orientador Dr Virmondes, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo brilhantismo.

À equipe do Serviço de Cirurgia Plástica da UFTM Dr. Manoel Pereira da Silva Neto, colega de trabalho, pela amizade, pelas oportunidades de aprendizado em Cirurgia Plástica, pela troca de conhecimentos e estímulo constante; Dr. Marco Túlio Rodrigues da Cunha, pelo incentivo e auxílio na elaboração deste trabalho. Aos residentes, agradeço por toda a ajuda que me deram, principalmente na fase de recrutamento e operação dos pacientes. Pude ensinar-lhes bastante sobre técnica operatória e cicatrização, mas aprendi muito com todos eles, principalmente sobre solidariedade, respeito e gratidão.

Às funcionárias do ambulatório de Cirurgia Plástica da UFTM, Nilza, Renata, Sônia e Estefânia, pelo apoio e disponibilidade.

Aos meus irmãos Eduardo e Renata, cunhada Bruna e cunhado Marcelo, pelo suporte constante em minha vida. Aos meus familiares, avó Conceição, Tia Isabel, Ana Luiza, minha sogra Nelma e meu sogro Djalma, pelo companheirismo e compartilhamento de vida.

Aos meus amigos pela ternura, ombro amigo e pelas palavras de solidariedade nos momentos difíceis.

Minha gratidão aos pacientes portadores de queiloide, que participaram deste estudo, ou não, pela esperança e confiança depositada em nós.

RESUMO

As cicatrizes queloidianas atualmente são consideradas processos inflamatórios crônicos e não mais neoplasias benignas da pele. Definimos queloides como cicatrizes patológicas hiperproliferativas fortemente inflamadas. Os fatores de crescimento e as citocinas apresentam funções importantes na fisiopatologia inflamatória do quelóide. Objetiva-se com esse estudo a análise da expressão *in situ* do RNAm de algumas citocinas e fatores de crescimento na cicatriz queloidiana em comparação com cicatrizes normais, dentre elas citamos TGF- β , FGF, IL-33, IL-22, arginase-1 e 2, iNOS, VIP e VIP-R1, TAC e TAC-R1. O estudo da expressão dessas substâncias nos queloides pode auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de formação dessa cicatriz, de tal forma que a manipulação desses fatores na ferida possa ser uma estratégia terapêutica para reduzir o processo de formação de queloides. Para isso coletamos amostra de tecido cicatricial por biópsia de cicatriz queloidiana e de cicatriz normotrófica, após armazenamento em *RNA later*, o material foi processado para extração do RNAm, confecção de cDNA e finalmente realização de qPCR. Foram avaliadas 98 biópsias, sendo 53 de pacientes com quelóide e 45 cicatrizes normais. A idade dos pacientes portadores de quelóide variou de 11 a 73 anos, com média de idade de 28 anos, predominância do gênero feminino em 58,5% e da etnia negra em 64,15% dos pacientes, e localização no lóbulo da orelha em 73,6% dos casos. Encontramos significativamente uma maior expressão de RNAm para TGF- β , IL-22 e ARG-1 nos queloides quando comparados às cicatrizes normais. Para IL-33, ARG-2 e VIP-R1 apesar do maior número de cópias de RNAm encontrado nos queloides, essa diferença não foi significativa. Os níveis de RNAm das amostras estudadas não foram detectáveis para FGF, iNOS, VIP, TAC e TAC-R1 e, portanto, os achados dessas substâncias foram inconclusivos nesse estudo. Portanto, entender os mecanismos celulares e moleculares que controlam a resposta inflamatória durante a cicatrização cutânea poderá promover estratégias para melhorar o tratamento de milhares de pacientes afetados pelas patologias cicatriciais ao redor do mundo. Enfim, novos estudos para o entendimento da associação dessas moléculas com os queloides se fazem necessários.

PALAVRAS-CHAVES: quelóide, cicatrização, citocinas.

ABSTRACT

Keloid scars are currently considered a chronic inflammatory process and no more a benign skin tumor. We define keloids as heavily inflamed hyperproliferative pathological scars. Growth factors and cytokines have important functions in the keloid inflammatory etiopathogenesis. The aim of this study was to analyze the in situ expression of TGF- β , FGF, IL-33, IL-22, arginase-1 and 2, iNOS, VIP and VIP-R1, TAC and TAC-R1 in keloid and normal scars. The study of the expression of these substances in keloids can help in understanding the pathophysiological mechanisms of this scar formation, so that the manipulation of these factors and interleukins in the wound may be a therapeutic strategy to reduce the process of keloid formation. For this we collected a scar tissue sample by keloid scar and normotrophic scar, after storage in later RNA, the material was processed for mRNA extraction, cDNA preparation and finally qPCR. 98 biopsies were evaluated, 53 of which had keloid and 45 normal scars. The age of patients with keloid ranged from 11 to 73 years, with a mean age of 28 years, there was predominance of the female gender with 58.5%, 64.15% of the patients belonged to the black ethnic group, and the most common location was in the earlobe in 73.6% of the cases. We found significantly greater expression of TGF- β , IL-22 and ARG-1 in keloids when compared to normal scars. For IL-33, ARG-2 and VIP-R1, despite the higher number of copies of mRNA found in keloids, this difference was not significant. However, for FGF, iNOS, VIP, TAC and TAC-R1 the mRNA levels were not detectable, and therefore the findings of these substances were inconclusive in this study. So, understanding the cellular and molecular mechanisms that control the inflammatory response during cutaneous healing may promote strategies to improve the treatment of patients with keloids. Finally, new studies to understand the association of these molecules with keloids are necessary.

KEYWORDS: keloid scar, wound healing, citokines.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características gerais e clínicas dos pacientes portadores de queiloide.44

TABELA 2. Expressão de RNAm relativo à FGF, VIP, TAC, TAC-R1 e iNOS.....53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspecto clínico típico de queloides em orelha, cicatriz de cesariana e dorso, respectivamente.	20
FIGURA 2. Aspecto clínico da cicatriz hipertrófica abdominal e torácica.....	20
FIGURA 3. Atividade da cicatriz queloideana: prurido, hiperemia, endurecimento e crescimento ativo.....	34
FIGURA 4. Aplicação intralesional de corticoide (triancinolona) no queloide.	36
FIGURA 5. Excisão parcial intralesional de queloide inativo em lóbulo de orelha direita justificado pelo tamanho extenso da lesão.	38
FIGURA 6. Excisão total extralesional de queloide inativo em região inguinal direita.	38
FIGURA 7. Aplicação de compressão mecânica com placa de silicone em pós-operatório de excisão de queloide, medida adjuvante para profilaxia de recidiva.	39
FIGURA 8. Aparelho de PCR em tempo real <i>StepOnePlus</i> (<i>Applied Biosystems</i> – EUA). ...	42
FIGURA 9. Curva de amplificação dos ciclos de PCR para cDNA da ARG-1 e β -actina, incluindo grupo de queloides e grupo controle.	42
FIGURA 10. Paciente com queloide inativo em orelha esquerda, submetida à excisão extralesional, seguida por três sessões de corticoterapia, sem recidiva após 18 meses.	45
FIGURA 11. Paciente com queloide em orelha esquerda. Realizada três sessões de corticoide intralesional, seguida por cirurgia extralesional e corticoide pós-operatório (cinco sessões), sem recidiva após 12 meses.	45
FIGURA 12. Paciente com queloide em cicatriz de cesariana, realizado três sessões de corticoide intralesional seguida por cirurgia extralesional e triancinolona pós-operatória (duas sessões), sem recidiva após seis meses.....	46

FIGURA 13. Paciente com múltiplos queloides, de difícil tratamento. Proposto corticoide intralesional (12 sessões) seguido por ressecções cirúrgicas intralesionais parceladas, devido à extensão das lesões, e triancinolona pós-operatória, com grande tendência à recidiva. Mantem aplicação mensal de corticoide para estabilizar crescimento das lesões. Em seguimento há 24 meses.	47
FIGURA 14. Análise da expressão de cópias de RNAm para o TGF- β	48
FIGURA 15. Análise da expressão de cópias de RNAm para IL-33.	49
FIGURA 16. Análise da expressão de cópias de RNAm para IL-22.	50
FIGURA 17. Análise da expressão de cópias de RNAm para ARG-1.	51
FIGURA 18. Análise da expressão de cópias de RNAm para ARG-2.	52
FIGURA 19. Análise da expressão de cópias de RNAm para VIP-R1.	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas	mm milímetros
ARG-1 Arginase-1	mmHg milímetros de mercúrio
ARG-2 Arginase-2	MMP Metaloproteinase
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar	mRNA Ácido ribonucleico mensageiro
CE corticoesteróide	NK Natural Killers
CEP Comitê de Ética em Pesquisa	NO Óxido nítrico
cGy centigrays	PDGF Fator de crescimento derivado das plaquetas
CT Ciclo Limiar	PMNs Leucócitos polimorfonucleares
DNA Ácido desoxirribonucleico	RNA Ácido ribonucleico
dNTP Desoxirribonucleotídeos fosfatados	rS Teste de Spearman
EGF Fator de crescimento epidérmico	qRT-PCR Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativa
EUA Estados Unidos	qPCR <i>Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa</i> quantitativa
FGF Fator de crescimento de fibroblastos	SMAD Proteína intracelular transdutora de sinal do fator de transformação do crescimento
HC – UFTM Hospital de clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro	SUS Sistema Único de Saúde
IgE Imunoglobulina E	TAC1 Taquicinina
IL-1 Interleucina 1	TAC-R1 Receptor de taquicinina
IL-6 Interleucina 6	TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
IL-10 Interleucina 10	TGF- β Fator de transformação do crescimento beta
IL-22 Interleucina 22	TNF- α Fator de necrose tumoral alpha
IL-33 Interleucina 33	U Teste de Wilcoxon
iNOS Óxido nítrico sintase induzível	
MEC Matriz extracelular	
ml mililitro	

UFTM Universidade Federal do Triângulo
Mineiro

VIP Peptídeo intestinal vasoativo

VIP-R1 Receptor do peptídeo intestinal
vasoativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Processo de cicatrização de feridas.....	15
1.2. Cicatrização patológica: quelóide.....	19
1.2.1. Definição e aspectos clínico-epidemiológicos.....	19
1.2.2. Etiologia e fisiopatogenia.....	24
1.3. Justificativa do estudo.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	32
3.1. Aspectos éticos.....	32
3.2. Casuística.....	32
3.3. Protocolo clínico de tratamento dos pacientes portadores de quelóide.....	33
3.4. Definição da atividade da cicatriz quelóideana.....	33
3.5. Escolha do tratamento.....	35
3.5.1. Corticoide intralesional.....	35
3.5.2. Cirurgia.....	36
3.5.3. Terapias complementares.....	38
3.6. Coleta do material.....	40
3.7. Extração de RNA.....	40
3.8. Confeção de cDNA.....	41
3.9. Reação de PCR quantitativo (qPCR).....	41
3.10. Análise estatística.....	43
3.11. Normas para confecção do manuscrito.....	43
4. RESULTADOS.....	44
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. ANEXOS.....	83
Anexo A. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	83
Anexo B. Proposta para prontuário de registro de pacientes.....	85
Anexo C. Fluxograma de tratamento dos quelóides.....	86
Anexo D. <i>Primers</i> do sistema <i>Taqman</i> (<i>Applied Biosystems</i> – EUA).....	87

1- INTRODUÇÃO

1.1. PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

O reparo de feridas cutâneas requer interações complexas e altamente coordenadas entre queratinócitos, fibroblastos e células imunes para restaurar a barreira epidérmica e a arquitetura do tecido após lesão aguda. A cicatrização nada mais é do que uma tentativa biológica de restaurar a integridade do tecido lesado, através da reposição por um tecido conjuntivo neoformado não especializado. Para que uma cicatriz seja considerada normal é necessário que haja equilíbrio entre o depósito e a reabsorção de colágeno no tecido fibroso cicatricial. (HOCHMAN, B., LOCALI, R. F., OLIVEIRA, L. Q. R., FERREIRA, L. M, 2004)

A cicatrização envolve uma sequência de fases: inflamatória, fibroplasia e maturação, que são mediadas por células, citocinas, fatores de crescimento e fatores quimiotáticos que se organizam harmoniosamente para resultar numa cicatriz normal, estética e funcional. O processo cicatricial inicia-se imediatamente após a lesão dos tecidos, e os primeiros mediadores químicos liberados após a injúria tecidual visam à hemostasia, através de vasoespasmo e à formação do coágulo. (SLEMP; KIRSCHNER, 2006)

Todo esse processo ocorre mediado inicialmente pelas plaquetas na hemostasia primária, com formação do tampão plaquetário, e pelas células endoteliais que liberam substâncias como tromboxanas que interferem na contratilidade da musculatura lisa vascular, promovendo vasoconstrição. (FROJMOVIC; MILTON, 1982) A degranulação plaquetária libera potentes fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator beta transformador do crescimento (TGF- β). Esses fatores são quimiotáticos e atuam nas células epidérmicas, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. Posteriormente é iniciada a hemostasia secundária, através do fator de Hageman (XII da coagulação) e o fator tecidual ativado que iniciam uma cascata de reações que levam à transformação da protrombina em trombina. A trombina cliva o fibrinogênio em fibrina, que é responsável pela formação do coágulo. O sistema gerador

de cininas está associado ao sistema de coagulação, já que o fator de Hageman ativado contribui para transformar a pré-caliceína em caliceína, que atua na globulina, e o cininógeno para formar bradicinina. A bradicinina ativa a fosfolipase C, que transforma fofolípideos em ácido araquidônico por ação de ciclooxigenases. O ácido araquidônico origina prostaglandinas, e estas, por sua vez, agem em receptores de várias células para controlar a atividades dos macrófagos e linfócitos, como mediadores inflamatórios, induzindo a vasodilatação, e assim iniciam-se os sinais clínicos da inflamação como rubor e calor. (LIU, C. Y. C., S, 1990).

A fase inflamatória da cicatrização inicia-se quando uma lesão ativa a cascata da coagulação, das cininas e dos complementos, promovendo a liberação de numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, que estimulam a migração de células inflamatórias para o sítio da ferida. (NICOLETIS; BAZIN; LOUS, 1977) Nas primeiras 24h após o trauma tecidual, neutrófilos desbridadam a lesão, e são responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos e pela limpeza da ferida. Após 48 a 72 horas, o processo cicatricial normal transita da fase inflamatória para a fase proliferativa, e a principal célula responsável por guiar todo esse processo é o macrófago, que libera fatores quimiotáticos que atraem os fibroblastos para ferida, responsáveis pela produção da matriz extracelular. Feridas profundas e extensas, como queimaduras, trauma de partes moles, podem prolongar a fase inflamatória, com aumento da concentração de citocinas pró-fibróticas, como: PDGF, TGF- β , fator 1 do crescimento *insulino-like*, que podem levar à formação de cicatrizes hiperproliferativas. Depois da hemostasia e do desbridamento da ferida pelas células inflamatórias, é necessário que a derme danificada comece o processo de reparação, com a formação do tecido de granulação. (KISCHER et al., 1989)

Outras citocinas são geradas ainda durante a fase inflamatória do processo cicatricial, principalmente pelas plaquetas, leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, como o TGF- β , interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 6 (IL-6) que são agentes importantes nas reações locais e sistêmicas após agressões aos tecidos. (ELIAS et al., 1987)

Após a degradação do coágulo, rico em fibrina, pela plasmina, ocorre sua substituição por uma matriz rica em fibronectina e ácido hialurônico. (LOWRY, 1993) A fase proliferativa é composta de três eventos importantes que sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória: neo-angiogênese, fibroplasia e epitelização. Este fase caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido

hialurônico. Esta fase inicia-se por volta do 3º dia após a lesão, perdura por duas a três semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz. A neo-angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, necessária para manter o ambiente de cicatrização da ferida. Em todas as feridas, o suprimento sanguíneo dos fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno provém de um intenso crescimento de novos vasos, caracterizando a cicatrização por segunda intenção e o tecido de granulação. Os novos vasos formam-se a partir de brotos endoteliais sólidos, que migram no sentido da periferia para o centro da ferida, sobre a malha de fibrina depositada no leito da ferida. A bradicinina, a prostaglandina e outros mediadores químicos oriundos dos macrófagos, ativados, estimulam a migração e a mitose das células endoteliais. A neo-angiogênese é responsável não apenas pela nutrição do tecido, com uma demanda metabólica maior, como também pelo aumento do aporte de células, como macrófagos e fibroblastos, para o local da ferida. (GONZALEZ, A. C. D. O. C., TILA FORTUNA; MEDRADO, ALENA RIBEIRO ALVES PEIXOTO, 2016).

Durante a fase proliferativa da cicatrização, fibroblastos são recrutados para a ferida a fim de sintetizar o andaime para reparação tecidual, chamado de matriz extracelular (MEC). A fibroplasia é caracterizada pela formação de colágeno, principal componente da MEC, pelos fibroblastos atraídos para o local da ferida. Após o trauma, células mesenquimais normalmente quiescentes e esparsas no tecido normal, são transformadas em fibroblastos e atraídas para o local inflamatório, onde se dividem e produzem os componentes da MEC. O fibroblasto só aparece no sítio da lesão a partir do 3º dia, quando os PMNs já fizeram seu papel higienizador da área traumatizada. A função primordial dos fibroblastos é sintetizar colágeno. O colágeno é uma proteína de alto peso molecular, composta de glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina, que se organiza em cadeias longas de três feixes polipeptídicos em forma de hélice, responsáveis pela força da cicatriz. A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células, da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto, em presença de co-enzimas (vitaminas A, C e E), ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. O colágeno é o material responsável pela sustentação e pela força tênsil da cicatriz, produzido e degradado continuamente pelos fibroblastos. (MARTIN, 1997)

No processo inicial da reepitelização, há a migração de células epidérmicas provenientes dos folículos pilosos e outros anexos cutâneos para o epitélio. Após sua migração, há aumento da proliferação epitelial nas margens da ferida, para produzir a

aderência das células necessárias à cobertura. Os queratinócitos auxiliam nesse processo, produzindo fibronectina, colagenase e colágeno tipo V. A fibronectina é um importante componente da matriz e promove aderência dos queratinócitos. Os queratinócitos são fonte de fatores de crescimento e estão envolvidos no processo inflamatório e imunológico da ferida. (MCCAULEY et al., 1992)

Por fim, na última fase da cicatrização, a fase de maturação e remodelamento, ocorre a contração da ferida através de um movimento centrípeto das bordas com o objetivo de fechamento em conjunto para a formação do tecido cicatricial. Os fibroblastos são as células mais importantes nesse processo. Eles são submetidos a mudanças fenóticas durante a formação do tecido de granulação, cuja etapa final resulta em miofibroblastos que modificam continuamente sua interação com a MEC. Essas células contêm estrutura especializada, conectando seus microfilamentos, as fibronectinas, que interagem com as fibras colágenas. Quando os microfilamentos se contraem, a força é transmitida para toda a matriz, mediando o processo de contração. No quelóide, os miofibroblastos estão geralmente ausentes. Ainda nesse processo de remodelação, ocorre a maturação da ferida após a 3ª semana e caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno. Há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da colagenase. Dentre as colagenases, destacamos as metaloproteínases (MMP), que são enzimas que digerem proteínas da MEC e que apresentam funções importantes em diversos estágios da cicatrização, reparação tecidual e remodelação. A investigação da expressão das MMP é de grande interesse em estudos sobre os processos fisiopatológicos das cicatrizes hiperproliferativas. O desequilíbrio da relação entre produção e degradação do colágeno favorece o aparecimento de cicatrizes hipertróficas e queloides. O aumento da resistência tênsil cicatricial deve-se à remodelagem das fibras de colágeno, com aumento das ligações transversas e melhor alinhamento do colágeno, ao longo das linhas de tensão. A fase de maturação dura toda a vida da ferida, embora o aumento da força tênsil se estabilize, após um ano, em 70 a 80% da pele intacta. (SZEZERBATY, 2016)

As várias fases do processo cicatricial são reguladas em nível bioquímico por sinalizadores. Famílias de moléculas, incluindo TGF- β , proteínas ativadoras da mitose e MMP trabalham em conjunto para regular a cicatrização normal. As moléculas que efetuam a conexão dos sinalizadores e as fases do processo cicatricial ainda estão incompletamente elucidadas. A complexidade desse sistema é vulnerável à formação de cicatrizes anômalas. (CARVALHAES et al., 2015)

1.2. CICATRIZAÇÃO PATOLÓGICA: QUELOIDE

1.2.1. DEFINIÇÃO E ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

O processo de reparo de uma ferida abrange amplo espectro de resultados, desde ausência de cicatrização até cicatrizes hiperproliferativas. Dentre as cicatrizes hiperproliferativas, destacam-se os queloides e as cicatrizes hipertróficas. Os queloides são cicatrizes que respondem de maneira exagerada a uma lesão cutânea. O que-loide foi descrito há mais de três milênios nos Papiros de Smith. Porém, quem primeiro o descreveu na literatura científica foi Jean Louis Alibert em 1806, denominando-o de "cancroide", termo posteriormente substituído por "queloide" (do grego: kelth = tumor + eidoz = forma), para evitar confusão com o câncer e suas conotações. (FERREIRA et al., 2009)

O que-loide caracteriza-se por estender-se lateralmente para os tecidos adjacentes em relação ao ponto de origem, é uma cicatriz espessa e elevada, de superfície bocelada ou lisa, e de coloração variando entre cor de pele, avermelhada ou hiperocrômica. Essa lesão pode ter crescimento contínuo ou intermitente, com ausência de regressão significativa, e com alta tendência à recidiva após a ressecção. (APPLETON; BROWN; WILLOUGHBY, 1996)

O principal diagnóstico diferencial do que-loide a ser considerado é a cicatriz hipertrófica. As cicatrizes hipertróficas possuem um crescimento limitado à lesão que a originou com tendência à regressão espontânea após nove meses. Alguns autores consideram queloides e cicatrizes hipertróficas como graus variados de expressão da mesma doença, enquanto outros consideram a fisiopatogenia entre as duas completamente diferente. (KISCHER; SHETLAR; CHVAPIL, 1982)

Este fato poderia ser refletido pela dificuldade, às vezes existente, em diferenciar clinicamente o que-loide da cicatriz hipertrófica, onde apenas o exame histopatológico pode fazer o diagnóstico. No que-loide as fibras colágenas ficam dispostas em nódulos e

de forma aleatória, estando entremeadas com abundante mucina e praticamente com ausência de fibras elásticas, enquanto na cicatriz hipertrófica as fibras se dispõem de forma mais ordenada e formando feixes paralelos. Porém, na periferia do queloide comumente observam-se fibrilas colágenas dispostas similarmente a uma cicatriz normotrófica. O estudo histológico do tecido queloideano revela abundante colágeno do Tipo I (colágeno adulto) e uma proporção aumentada do colágeno Tipo III (colágeno fetal). Os folículos pilosos e as glândulas sebáceas estão ausentes ou bastante diminuídos. Na microscopia eletrônica, os queloides apresentam sinais de serem hipóxicos, como evidenciado pela exuberância da camada endotelial dos vasos sanguíneos. (ROCKWELL; COHEN; EHRLICH, 1989)

FIGURA 1. Aspecto clínico típico de queloides em orelha, cicatriz de cesariana e dorso, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 2. Aspecto clínico da cicatriz hipertrófica abdominal e torácica.



Fonte: Arquivo pessoal.

As queixas principais dos pacientes portadores de quelóide são: dor, prurido e grande desconforto estético. Apresenta uma fase de atividade, exibindo sinais e sintomas, e uma fase de inatividade ou estável, sem a presença dos mesmos. Na fase de atividade, além de um objetivo e gradativo crescimento, os sintomas mais frequentes são o prurido (74%), a dor (19,1%), presença de infecção (1,5%) e a evolução para ulceração (0,6%). (HOCHMAN, B., LOCALI, R. F., OLIVEIRA, L. Q. R., FERREIRA, L. M, 2004) Cabe salientar também a importância da perturbação pessoal em termos de estética (56,8%). (DATUBO-BROWN, 1990)

A maioria das lesões (92,3%) localiza-se em posição superior ao abdome. Os lóbulos das orelhas e a região pré-esternal são os locais mais frequentes, seguidas pela região lateral da face, pescoço, ombro e dorso. (REIS, 1994)

O quelóide também pode ter um caráter temporal, pois pode desenvolver-se num determinado local do corpo, a partir de uma incisão cirúrgica e, futuramente, uma nova incisão no mesmo local, ou imediatamente vizinho, pode não desenvolver esse distúrbio cicatricial. Tem um caráter imprevisível e uma evolução individualizada em cada caso. Regiões da pele com inserções de fibras musculares ou com variações específicas na estrutura da camada dérmica, como a placa aréolo-papilar da mama, pênis, escroto e pálpebras são raramente afetados por quelóide, por motivos ainda não esclarecidos. (HOCHMAN, B., LOCALI, R. F., OLIVEIRA, L. Q. R., FERREIRA, L. M, 2004)

Estatísticas nos Estados Unidos demonstram uma prevalência de 1,5% de pessoas portadoras de quelóide em relação à população total. Na África as estatísticas chegam a demonstrar uma alta prevalência que gira em torno de 6%. (OLUWASANMI, 1974) No Brasil, o quelóide é uma lesão frequente, apesar de não existir estatísticas precisas sobre o assunto, principalmente devido à miscigenação populacional. A incidência de quelóides em pessoas de etnia afrodescendente varia de 4,5% a 16%, aproximadamente 15 vezes mais do que na etnia branca. (MCCAULEY et al., 1992) O quelóide, por ser mais frequente em afrodescendentes, orientais e hispânicos, tem sido associado à presença de melanócitos, melanina ou hormônio alfa-estimulante dos melanócitos. (HOCHMAN, BERNARDO 2012)

A frequência maior de quelóides encontra-se em pacientes jovens, entre 10 a 30 anos, com risco maior na segunda década de vida, fato associado à influência dos hormônios sexuais. O quelóide ocorre com predisposição maior em pessoas do gênero feminino em relação ao masculino. Relata-se quase o dobro (1,8/1) de incidência em mulheres em relação a homens, embora alguns pesquisadores não encontraram correlação entre o risco de desenvolver quelóide e o gênero. (SCHIERLE; SCHOLZ; LEMPERLE, 1997)

Acredita-se, atualmente, que não existe quelóide espontâneo, e que as lesões sem causa aparente são provocadas por ferimentos puntiformes, não percebidos pelo paciente, como pequenas pústulas, acne ou até picada de insetos. (FURTADO; HOCHMAN; FARBER; et al., 2012)

O objetivo terapêutico depende das queixas estéticas do paciente e sintomas provocados pelo quelóide. Embora a literatura sobre o assunto seja ampla, ainda não há um tratamento estabelecido pela eficácia na cura do quelóide. (GAUGLITZ, 2013)

A corticoterapia é considerada uma primeira linha de tratamento para quelóide. A triancinolona tem sido utilizada em quelóides desde 1965 por sua alta eficácia. Seu efeito maior é na fase inflamatória e proliferativa, interferindo no eritema e edema locais decorrentes da dilatação capilar. Há indícios de sua ação na atividade fagocitária de macrófagos e modulação da função dos fibroblastos na síntese do colágeno. (WONG et al., 2016) A infiltração intralesional de triancinolona tem adquirido importante papel tanto na profilaxia e no tratamento do quelóide. Apesar da melhora relativa, frequentemente não ocorre uma regressão completa da lesão. (TRISLIANA

PERDANASARI et al., 2014) O corticosteroide (CE) inibe a síntese proteica e a migração dos fibroblastos, mas o exato mecanismo da redução do colágeno ainda permanece não completamente esclarecido. Contudo, essas infiltrações acarretam, num curto período, uma significativa regressão dos sintomas como prurido e dor, além de reduzirem o volume da lesão. Porém, os principais efeitos colaterais locais são atrofia, ulceração, despigmentação e telangiectasias, presença de depósitos brancos de corticoide na cicatriz, principalmente depois de repetidas infiltrações. (ROQUES; TEOT, 2008) A associação da ressecção cirúrgica com a infiltração intralesional de CE reduz o índice de recidiva para menos de 25%. (DONKOR, 2007; ROSEN et al., 2007)

A ressecção operatória da lesão, que há mais de um século foi praticamente o único tratamento do queloide, já se mostrou ineficaz como método isolado. A exérese sem outra associação terapêutica apresenta um índice de recidiva que varia de 45% a 100%, principalmente quando operados queloides em atividade. Quando associamos a cirurgia com corticoterapia a taxa de recidiva reduz para 15 a 30%, a depender da metodologia da infiltração do corticoide. Enquanto que a associação pós-operatória da betaterapia reduz a recorrência para 10 a 15%. (AGBENORKU, 2000; SCLAFANI et al., 1996)

É preferível ressecar uma lesão queloideana na fase de inatividade. Nesse caso, a excisão do queloide deve ser preferencialmente, total e justalesional, ou seja, imediatamente na transição com a pele íntegra, com retirada completa do tecido fibroso excedente. Se a lesão estiver em fase de atividade, é mais conveniente aguardar até a fase de inatividade para ressecá-la. (TAN et al., 2010) Para isso, deve-se explicar detalhadamente ao paciente o motivo dessa espera, e se necessário, orientá-lo a utilizar outras medidas para amenizar o desconforto, como compressão elástica e hidratação local. Nos casos em que houver necessidade de ressecar o queloide em plena fase de atividade, excisa-se internamente a lesão deixando intacta a margem periférica do queloide (cerca de 2 mm), isto é, fazendo-se uma ressecção intralesional e não uma retirada total da lesão. Assim sendo, as margens da lesão já não teriam, teoricamente, um potencial de atividade proliferativa. (OGAWA, 2010)

Atualmente, ainda a melhor opção de associação é a complementação por betaterapia, após 24 a 48 horas da excisão do queloide, com o intuito de atenuar a fibroplasia. Indica-se o início da betaterapia após 24-48 horas da excisão, com o estrôncio,

numa carga total de 2.000 cGy na cicatriz de cada queiloide ressecado, fracionada em 10 sessões de 200 cGy em dias alternados. O efeito adverso mais comum da betaterapia é a discromia da cicatriz, geralmente representada pela hiperpigmentação. Como a betaterapia provoca uma diminuição da fibroplasia, é conveniente, às vezes, retardar a retirada dos fios de sutura a fim de evitar deiscências parciais, que poderiam precipitar a recidiva do queiloide pela cicatrização por segunda intenção. Em crianças, pelo efeito radioativo pode ser descrita a indução de neoplasias tardias, então tentamos evitar abaixo dos 12 anos de idade. (SALLSTROM et al., 1989)

Outras modalidades de tratamento do queiloide incluem a operação com laser de dióxido de carbono, luz pulsada, a criocirurgia com nitrogênio líquido, o uso do 5-fluoruracil, do tamoxifeno, imiquimode, ácido retinóico e da toxina botulínica. Modalidades estas que, apesar de promissoras, ainda não possuem a eficácia científica comprovada e equiparada ao tripé de tratamento: corticoide, cirurgia e betaterapia. (BRUDNIK; PODOLEC-RUBIS; WOJAS-PELC, 2006)

O queiloide recidivado, na maioria das vezes, é maior que a lesão original. A recidiva ocorre em 37% dos casos até o 6º mês após a ressecção, 29% entre o 7º e 12º mês, 9% entre o 13º a 18º mês e 10% do 19º ao 24º mês. Portanto, o pico de incidência de recidiva ocorre ao longo do primeiro ano após o tratamento. Por isso, vários pesquisadores preferem esperar três a cinco anos antes de considerar que a terapia utilizada foi definitivamente curativa. (AL-ATTAR et al., 2006)

Cicatrizes queiloideanas que se originaram a partir de feridas infectadas, apresentam maior índice de recidiva que as oriundas de cicatrizes operatórias. Porém, não existe diferença significativa na relação sucesso/recidiva pós-operatória em relação ao tamanho original da lesão (para semelhantes graus de tensão na sutura), em relação à idade da lesão para queloides já inativos, e em relação à etnia da pessoa já operada. (PARK; CHANG, 2015) Entretanto, o índice de recidiva é maior quando são ressecadas lesões ativas, isto é, que estavam em crescimento ou com sintomas à época da operação. Portanto, prurido e/ou dor representam prognósticos mais desfavoráveis. Também, a presença de vários queloides simultâneos piora o prognóstico, em relação à presença de um único queiloide. De qualquer forma, recidiva anterior não representa necessariamente uma contraindicação para uma nova excisão. (PARK et al., 2011)

Em termos de profilaxia, há pouco disponível, merecendo destaque a compressão mecânica de uma ferida operatória recente em paciente com tendência a desenvolver quelóide. A compressão deve ser contínua, e pode ser exercida por vestes elásticas excedendo 24 mmHg, a qual reorientaria os feixes de fibras colágenas. Lâminas de silicone com malhas elásticas tem obtido um sucesso relativo no tratamento preventivo do quelóide. Embora o mecanismo ainda não esteja completamente esclarecido, cogita-se, em virtude de sua impermeabilidade sobre o estrato córneo, numa contínua hidratação cutânea, com redução da hiperemia e da fibrose incipiente. Todavia, essas lâminas não são indicadas sobre cicatrizes quelóideanas inativas ou antigas. Só possuem efeito quando aplicadas em cicatrizes imaturas, até 12 a 18 meses após o trauma ou cirurgia. (GOLD et al., 2001)

1.2.2. ETIOLOGIA E FISIOPATOGENIA

A etiologia desse distúrbio ainda está insuficientemente esclarecida. Apesar de ser classificado como uma disfunção cicatricial hiperproliferativa, o quelóide é caracterizado pela hiperprodução de colágeno, e secundariamente por uma hiperproliferação de fibroblastos na derme. O fibroblasto, secretando colagenase, manteria o balanço síntese/degradação da cicatriz regulando seu tamanho, já que a neoformação colágena pode manter-se normalmente por até 12 meses. O período crítico do processo de cicatrização, quando o equilíbrio entre a síntese e a lise de colágeno se desfaz, geralmente ocorre na 3ª ou 4ª semana após a lesão. Nesse momento, por motivo ainda não esclarecido, nos casos de quelóide a síntese torna-se maior que a lise, ou esta menor que a síntese, por tempo indefinido. (HOCHMAN, B.; NAHAS; et al., 2008)

A literatura aponta várias modalidades de pesquisa à procura da etiopatogenia do quelóide. Evidências genéticas definitivas quanto ao quelóide ainda não ficaram comprovadas, mas evidências sugerem polimorfismos de nucleotídeos isolados, em quatro loci de três cromossomos, associam-se significativamente com desenvolvimento de quelóides na população japonesa. Existe um polimorfismo (rs8032158) que se associa com a gravidade clínica do quelóide. Mas existem provavelmente outros fatores genéticos ainda não identificados. (NAKASHIMA et al., 2010)

Sugeriu-se a hipótese de que a suscetibilidade ou risco pessoal em desenvolver quelóide poderia ser apenas um fator predisponente, e não um fator de herança genética determinante propriamente dita. Evidências endócrinas apontam um aumento significativo de incidência de quelóide na puberdade, num período de exaltação e amadurecimento do eixo hipofisário-gonadal e a exacerbação do quelóide durante e gestação, com uma relativa regressão na menopausa. A preponderância em adolescentes e também em gestantes está relacionada aos hormônios sexuais, estrógenos e andrógenos, que possuem efeitos vasodilatadores e intensificam a inflamação. (KOONIN, 1964)

O Hormônio Estimulante dos Melanócitos, também conhecido por Hormônio Melanotrófico ou Melanotrofina, também poderia influir na formação do quelóide. O quelóide é mais frequente em regiões da pele onde há maior concentração de melanócitos. Áreas pouco pigmentadas e com deficiência de glândulas sebáceas são raramente locais de quelóide. Essa lesão também é quase inexistente na planta do pé e na palma da mão, mesmo em pessoas portadoras de cicatrizes quelóideanas, apesar de essas regiões estarem constantemente sujeitas a atritos e ferimentos. O quelóide tampouco foi descrito em pessoas albinas. Paradoxalmente, o fator melanocítico, propriamente dito, está ausente ou presente em quantidades ínfimas em lesões quelóideanas. (SONG, 2014)

Evidências vasculares também demonstram que pacientes com hipertensão arterial severa, mais frequentes na população afrodescendente, apresentam uma incidência com significância estatística maior para apresentar quelóide em relação a indivíduos com pressão arterial normal, tanto em pessoas negróides ou caucasóides. Esse tipo de hipertensão arterial, que responde ao enalapril (enzima inibidora da conversão da angiotensina II), demonstrou resultados favoráveis no sentido de regredir casos de quelóide durante o tratamento da hipertensão severa pelo medicamento, a despeito dessas lesões não serem responsivas à maioria dos tratamentos. (HUANG; OGAWA, 2014)

As pesquisas envolvendo evidências imunológicas revelam que a imunoglobulina E (IgE) também poderia participar no quelóide, à medida que o nível sérico dessa imunoglobulina está diretamente relacionado ao nível de histamina mastocitária aumentada no tecido quelóideano; pessoas com história de doenças atópicas e alergias são mais frequentemente encontradas nos portadores de quelóide, em relação às pessoas com cicatrização normal. Ainda, pessoas do grupo sanguíneo A tem mostrado maior predisposição ao quelóide. (SMITH; SMITH; FINN, 1987)

Vários fatores de risco locais aumentam ou prolongam a inflamação da derme reticular durante o processo de cicatrização. Um deles é infecção da ferida e forças mecânicas locais. Vários estudos suportam essa evidência. Primeiramente, queloides assumem formas específicas em cada local do corpo, como em borboleta nos ombros, em garra de caranguejo na região anterior do tórax. Isso sugere que o crescimento do quelóide é fortemente determinado pela direção da tensão aplicada sobre a pele ao redor da ferida. Por exemplo, na região pré-esternal a direção da tensão é horizontal pela contração do músculo peitoral maior, portanto, os queloides dessa região sempre apresentam crescimento horizontal. (AKAISHI et al., 2008)

Os queloides, conforme ressaltamos, são multifatoriais relacionando-se com agentes físicos, químicos, biológicos e endógenos. Parece haver predisposição genética, com resposta imunitária exacerbada relacionada a fatores emocionais. Apesar da compreensão, até o presente momento, sobre os mecanismos *in vitro* a respeito da biologia da cicatrização, ainda não se sabe o bastante sobre as ações biológicas desses fatores no quelóide *in vivo*. Um problema chave que contribui para essa dificuldade reside no fato do quelóide ser descrito apenas em seres humanos, fator que tem tornado a pesquisa experimental *in vivo* ainda muito incipiente. (FERREIRA et al., 2009; HOCHMAN, B. et al., 2015)

Atualmente as cicatrizes quelóideanas são consideradas processos inflamatórios crônicos e não mais neoplasias benignas da pele. Os queloides são cicatrizes que respondem de maneira exagerada a uma lesão ou irritação cutânea, incluindo trauma, queimadura, cirurgia, brincos e *piercings*, acne e foliculite. Notavelmente, lesões superficiais que não atingem a derme reticular nunca causam cicatrizes quelóideanas. Isso sugere que os queloides surgem em consequência à lesão desta camada de pele e a cicatrização patológica de feridas é caracterizada por inflamação contínua. Como resultado, a derme reticular nos queloides contém células inflamatórias, aumento do número de fibroblastos, neoformação vascular e depósitos de colágeno. Se a camada reticular é submetida à estimulação externa ou interna, a inflamação persiste e se torna cada vez mais pronunciada, gerando-se cicatrizes patológicas. Portanto, definimos queloides como cicatrizes patológicas fortemente inflamadas. (OGAWA, 2017)

Foi relatado que fatores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF- α , são expressos positivamente nos tecidos quelóideanos. Como resultado, Dong *et*

al. especularam que os genes pró-inflamatórios na pele de pacientes com queloides são sensíveis ao trauma, ou seja, que eles tendem a ser mais propensos a manter essa regulação positiva do que os mesmos genes em outras pessoas. Isso resulta em inflamação crônica que também explica o crescimento invasivo de queloides. Novamente, a regulação positiva de fatores pró-inflamatórios em queloides sugere que, ao invés de serem tumores cutâneos, queloides são distúrbios inflamatórios da pele, especificamente distúrbios inflamatórios da derme reticular. (DONG; MAO; WEN, 2013)

Os fatores de crescimento e as citocinas apresentam funções importantes na fisiopatologia inflamatória do queleide. Vários estudos sugerem que a resposta imune representa um papel significativo na patogênese das cicatrizes hiperproliferativas. (MCCAULEY et al., 1992)

Com base nesses achados, objetiva-se com esse estudo a análise da expressão *in situ* de algumas citocinas e fatores de crescimento na cicatriz queleideana em comparação com cicatrizes normais, dentre elas citamos TFG- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), Interleucina 33 (IL-33), Interleucina 22 (IL-22), arginase-1 e 2, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e receptor do peptídeo intestinal vasoativo (VIP-R1), taquicinina (TAC) e receptor de taquicinina (TAC-R1). O estudo da expressão dessas substâncias nos queloides, algumas já estudadas e outras não, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de formação dessa cicatriz, de tal forma que a manipulação da função desses fatores e interleucinas na ferida possa ser uma estratégia terapêutica bem recebida para reduzir o processo de formação de queloides.

O TFG- β provavelmente é o fator mais fibrogênico associado à formação de cicatrizes e o mais reconhecido por ter íntima relação com formação de queloides. Esse fator é um quimiotático forte para os fibroblastos, e induz sua ativação para formação do colágeno e da matriz extracelular. (LIU, W.; WANG; CAO, 2004)

O Fator de crescimento do fibroblasto (FGF) é uma proteína tipicamente mitogênica, com papel na organização de queratinócitos e cicatrização de feridas. Ele promove angiogênese, proliferação de fibroblastos e crescimento da matriz extracelular. (AKITA et al., 2008; BEENKEN; MOHAMMADI, 2009; NUNES et al., 2016)

A IL-33 é um membro da família de proteínas IL-1, produzido também por células endoteliais e fibroblastos, e atua como um alarme para modular as respostas imunes e

inflamatórias ao dano tecidual. Tem um papel na cicatrização de feridas, reside em queratinócitos da pele e sob condições de irritação e inflamação cutânea se comunicam com neurônios sensoriais desencadeando prurido. (TANIGUCHI et al., 2013)

A IL-22 é um membro de um grupo de citocinas chamado família IL-10, uma classe de potentes mediadores de respostas inflamatórias celulares. Alguns estudos investigaram o papel in vivo da IL-22 e descobriram que a sinalização de IL-22 é ativa em fibroblastos, e que direciona a expressão do gene da matriz extracelular e a diferenciação do miofibroblasto, associando o papel da IL-22 na patogênese de doenças fibróticas caracterizadas por defeitos no reparo tecidual mediado por fibroblastos. (JUN; LAU, 2010a;2010b; KONG et al., 2012; MCGEE et al., 2013)

A arginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e uréia. Possui duas isoformas, denominadas arginase tipo 1 e arginase tipo 2. A arginase tipo 1 (ARG-1) é mais abundante no fígado e é o principal responsável pela detoxificação da amônia em uréia. A arginase tipo 2 (ARG-2) atua principalmente na produção de ornitina como um precursor de prolina e glutamato. (CALDWELL et al., 2015) Estudos anteriores relacionaram alterações no metabolismo local da L-arginina, principalmente mediado pelas enzimas arginase e pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com a cicatrização patológica de feridas. No entanto, a contribuição da arginase para a cura de feridas permanece obscura. (CAMPBELL et al., 2013)

O óxido nítrico (NO) é um biomarcador ativo conhecido por regular as fases de cicatrização de feridas e tem sido implicado na patogênese da doença fibrótica. O NO é produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) que existe em três isoformas, dentre elas a iNOS. (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005) Um artigo de 2001 sugeriu que o excesso de produção de colágeno em queloides possa ser atribuído a níveis mais elevados do que o normal de óxido nítrico, pois o radical livre é um estímulo conhecido para síntese de colágeno de fibroblastos. Além disso, propôs que a epiderme basal seja uma fonte deste óxido nítrico adicional. (COBBOLD, 2001)

O peptídeo vasoativo intestinal (VIP) é um neuropeptídeo originalmente isolado como um vasodilatador. Não demorou muito para permear o campo da imunologia, surpreendentes novos atributos para VIP foram encontrados nos últimos anos, possivelmente uma molécula semelhante a uma citocina. (DELGADO; POZO; GANEA, 2004) O VIP foi mostrado como um fator de crescimento para proliferação de

queratinócitos e como um modulador de migração celular, além de induzir liberação de histamina por mastócitos causando vasodilatação. VIP pode ser envolvido na re-inervação do tecido ferido, porém, até o momento não existe uma associação clara descrita entre a expressão de VIP e cicatrizes queloidianas. (ASHRAFI; BAGUNEID; BAYAT, 2016; GONZALEZ et al., 1997; RAYAN et al., 1995; WOLLINA, 1993)

As taucicinas, exemplificadas pela substância P, são uma das mais intensamente estudadas famílias de neuropeptídeos, expressos em todo o sistema nervoso e imunológico. Contribuem para múltiplos processos de doenças, incluindo inflamação, dor e fibrose, e pode ser encontrada tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Há evidências emergentes de que a inervação cutânea pode desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas. Numerosos neuropeptídios, como VIP e substância P, que são secretados por fibras nervosas sensoriais e autonômicas são uma parte essencial durante distintas fases da cicatrização. (STEINHOFF et al., 2014)

1.3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

No presente estudo foi avaliada a expressão *in situ* do RNAm de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em queloides comparadas com grupo controle. A literatura aponta vários estudos sobre as hipóteses da formação da cicatriz queloidiana. A inexistência de uma causa definida para o queloides traz dúvidas e questionamentos tanto dos pacientes quanto do pesquisador/equipe de saúde que lida com pacientes portadores deste tipo de anomalia. O estudo da expressão dessas substâncias nos queloides pode auxiliar a compreender o mecanismo da cicatrização anormal e propiciar a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes, com enfoque na etiologia inflamatória do queloides.

2- OBJETIVOS

- Analisar a expressão *in situ* de RNAm para TGF- β , FGF, IL-33, IL-22, ARG-1, ARG-2, iNOS, VIP e VIP-R1, TAC e TAC-R1 na cicatriz queloidiana em comparação à cicatriz normal.

3- CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pelo protocolo CAAE nº 45647315.4.0000.5154 e todos os participantes assinaram, na primeira consulta, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (**Anexo A**)

3.2. CASUÍSTICA

Foram analisadas 98 biópsias, obtidas de 53 pacientes com queiloide e 45 de cicatrizes normais. As biópsias foram realizadas no Ambulatório de Cirurgia Plástica integrado ao Hospital de Clínicas da UFTM (HC-UFTM), Ambulatório Maria da Glória situado na Rua Frei Paulino, s/n, CEP: 38025-180, na cidade de Uberaba - MG, que funciona toda sexta feira no período da manhã, das 7:00 horas às 12:00 horas. Este ambulatório tem o intuito de triar os pacientes com queiloide e promover ações para melhorar o conforto através da escolha da melhor conduta terapêutica e estética.

Como critério de inclusão foram selecionados para compor o grupo de queloides os pacientes que apresentavam cicatrização anormal, com crescimento da cicatriz além das margens da ferida inicial, com sinais e sintomas de dor, prurido, rubor e endurecimento local, diagnóstico exclusivamente clínico de queiloide, de qualquer localização.

Não foram incluídos os pacientes que apresentavam cicatrizes hipertróficas, ou cicatrizes por fechamento por segunda intenção. Foram excluídos pacientes com uso de imunossupressor sistêmico, portadores de doenças autoimunes e imunodeficientes.

Os pacientes portadores de queiloide foram submetidos à retirada cirúrgica no momento oportuno da proposta terapêutica global, e um fragmento de tecido a ser desprezado foi coletado para o presente estudo. Para os controles, foram utilizados fragmentos de cicatriz normal retiradas de pacientes múltíparas durante a realização da

cesariana, ou então coleta de cicatrizes de qualquer paciente que fosse submetido a uma reabordagem cirúrgica com ressecção da cicatriz antiga.

3.3. PROTOCOLO CLÍNICO DE TRATAMENTO DOS PACIENTES PORTADORES DE QUELOIDE

Para formulação do protocolo seguimos os seguintes passos: o paciente é avaliado clinicamente e é definido o diagnóstico cicatricial, podendo ser quelóide, cicatriz hipertrófica ou outros distúrbios cicatriciais (cicatriz alargada, cicatriz deprimida, retrações ou bridas cicatriciais). São incluídos apenas pacientes com diagnóstico de quelóide, de qualquer idade, sexo ou raça; baseado na história e exame físico. Depois do diagnóstico clínico confirmado de quelóide, definimos o padrão de atividade da lesão: ativas - lesões que apresentam prurido, hiperemia reativa, endurecimento e crescimento ativo; e inativas - cicatrizes sem prurido, indolores, normocrômicas e sem crescimento, estáveis. O próximo passo, portanto, será a escolha do tratamento: corticoterapia intralesional, cirurgia excisional, betaterapia. Esses pacientes são então acompanhados ambulatorialmente, por um período médio de três anos, e enfim, avaliadas as respostas ao tratamento realizado, taxa de sucesso, índice de complicações, taxa de recidiva e fatores prognósticos. As seguintes variáveis foram registradas: sexo, idade, raça, história familiar, descendência negra, localização do quelóide, número de lesões, idade de aparecimento da primeira lesão, etiologia, outras cicatrizes, cirurgias prévias, comorbidades e medicações em uso, tratamentos prévios, recidiva, adesão ao tratamento, atividade do quelóide, tratamento proposto- corticoide, cirurgia, betaterapia, índice de sucesso e recidiva. Esse protocolo clínico foi criado no próprio serviço, pela disciplina de Cirurgia Plástica da UFTM, baseado em evidências e na literatura. É o fluxograma que orienta atualmente o tratamento dos pacientes portadores de quelóide em nosso hospital. **(Anexo B)**

3.4. DEFINIÇÃO DA ATIVIDADE DA CICATRIZ QUELOIDEANA

Os principais sintomas de um quelóide ativo são questionados na anamnese e incluem: prurido (principal sintoma, associado à presença de mastócitos e histamina na lesão), dor, endurecimento e crescimento ativo. A atividade é comprovada pelo exame físico, que demonstra hiperemia reativa da cicatriz, que desaparece a digito ou vitropressão, além da rigidez da lesão. O ato de coçar e traumas de repetição sobre o quelóide são fatores que estimulam sua atividade e crescimento. A atividade da cicatriz quelóideana é um fator de contraindicação cirúrgica. Um quelóide operado na fase ativa apresenta chance alta de recidiva, proibitiva, de quase 100%, e com lesões recidivadas maiores do que a cicatriz primária. Em quelóides ativos é indicado primeiramente o tratamento com corticoide intralesional; com objetivo de induzir inatividade da lesão para posterior complementação cirúrgica, se necessária. Em quelóides inativos, está liberada a abordagem cirúrgica inicialmente, sem aplicação de corticoide prévio. Sabe-se que a atividade cicatricial do quelóide no momento do diagnóstico é fator primordial para definir o tipo de tratamento, o sucesso, o prognóstico e risco de recidiva da lesão. Por esse motivo, por fatores éticos, não foi possível a biópsia do tecido quelóideano sem a aplicação do protocolo de tratamento previamente.

FIGURA 3. Atividade da cicatriz quelóideana: prurido, hiperemia, endurecimento e crescimento ativo.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.5. ESCOLHA DO TRATAMENTO (fluxograma - Anexo C)

3.5.1. CORTICOIDE INTRALESIONAL

As cicatrizes em atividade inicialmente são encaminhadas para a corticoterapia intralesional; justamente com o objetivo de inativar a lesão, com melhora do prurido, inibição do crescimento, e progressiva redução volumétrica e amolecimento do queleide. A opção cirúrgica apresenta restrições em lesões de grandes dimensões, que inviabilizem a ressecção com sutura primária, devido a elevada tração da cicatriz, e também em lesões

localizadas em locais de ruim prognóstico cirúrgico como dorso, ombro, tórax e membros. Nesses casos, a corticoterapia isolada representa uma boa alternativa tática.

O corticoide de escolha utilizado em todos os casos é a triancinolona, Triancil®, que modula a resposta inflamatória, dependendo da dose pode até anulá-la, possui ação antipruriginosa e antialérgica. Apresentação: 20 mg/ml. Dose: 0,1 ml/mm², Volume: 0,5 a 2,0 ml por sessão, a depender do tamanho, volume e extensão da lesão, e da rigidez e resistência à infiltração. Diluição com anestésico local – xilocaína 2% com ou sem vasoconstritor (a depender da localização), 20% do volume final da solução, com intuito de evitar distensão tecidual, por excesso de volume, que limitaria a quantidade final de corticoide injetado. Utilizamos seringa de 1 ml com agulha de 0,45 x 13 mm. Plano de injeção intralesional, intradérmico. Intervalos entre as sessões de três a quatro semanas. Número total de sessões individualizado conforme resposta e adesão terapêutica do paciente, variando de três a 12 sessões nos casos estudados. Avaliação de resposta: subjetiva, baseada na melhora dos sintomas referidos pelo paciente, alívio do prurido e da dor, amolecimento da lesão, redução de tamanho; e comprovação pelo exame físico, além de documentação fotográfica, evidenciando regressão da lesão.

FIGURA 4. Aplicação intralesional de corticoide (triancinolona) no queiloide.



Fonte: Arquivo pessoal.

Opções de corticoterapia:

- 1- Pré-operatório ou Isolada/Exclusiva: utilizada em lesões queiloideanas em atividade, para induzir regressão da lesão. Cicatrizes com contraindicação cirúrgica pela localização e tamanho da lesão, são feitas aplicações de corticoide como tratamento único.
- 2- Intra-operatório: controverso, pode inibir e retardar a cicatrização, favorecendo a ocorrência de deiscência. Se for realizada, deve ser feita a retirada tardia dos pontos e evitar ao máximo tensão na sutura.
- 3- Pós-operatório: tratamento complementar e coadjuvante à cirurgia com efeito profilático para prevenir recidiva. Iniciado esquema após a retirada dos pontos, duas a três semanas após a cirurgia de excisão do queiloide, infiltrações mensais, média de três aplicações totais, mas cada caso individualizado conforme seguimento clínico e risco de recidiva.

3.5.2. CIRURGIA

A cirurgia como monoterapia deve ser evitada, principalmente em cicatrizes ativas, devido ao alto risco de recidiva. Além do fato das lesões recidivas geralmente serem de maior tamanho e maior agressividade. Portanto, propomos o tratamento cirúrgico combinado como complementação às infiltrações de corticoide intralesional, após inativação e regressão máxima da lesão, principalmente para melhora do remanescente cutâneo, comum nesses casos, para otimização estética. Nos casos de lesões já inativas clinicamente, mesmo sem o tratamento prévio com corticoides, está autorizada a excisão cirúrgica, com corticoterapia pós-operatória profilática, que fazemos em todos os casos operados, de rotina; conforme descrito acima.

Neste momento, também surgem dúvidas quando às margens cirúrgicas de ressecção. Mais recentemente, chegou-se à conclusão que a extensão cirúrgica também seria influenciada pela fase de atividade da cicatriz queloidiana no momento da cirurgia. As cicatrizes inativas, com ou sem infiltração prévia de corticoide, devem ser tratadas com excisão justalesional, ou extralesional, se possível, com retirada completa da lesão, sem bordas remanescentes na cicatriz. Diferente de um queloides operado na fase de atividade franca. Nesses casos, deve ser evitada a cirurgia, porém quando realizada, deve ser intralesional, mantendo as margens da cicatriz ativa, e reduzindo assim a chance futura de recidiva. Porém, sempre complementamos com aplicações de corticoide no pós-operatório, que nessas situações é o principal fator de manter o queloides sob controle, prevenindo recidiva, além de monitorar o paciente com curtos intervalos de tempo.

Sempre que possível, optam-se pela ressecção completa da lesão queloidiana, desde que mantenha os princípios de menor trauma cirúrgico e menor tensão na sutura. Esses procedimentos cirúrgicos são realizados em caráter ambulatorial, sob anestesia local com xilocaína 2%. Utilizamos antibioticoprofilaxia por sete dias no pós-operatório, cefalosporina de segunda geração (cefadroxila 500 mg de 12/12h), pelo efeito deletério de uma infecção de ferida operatório com risco de deiscência da sutura e recorrência do queloides. No pós-operatório utilizamos medidas complementares como microporagem, hidratação local da cicatriz, uso tópico de gel de silicone, compressão externa com placas de silicone ou brincos de pressão para queloides em lóbulos de orelha. Realizamos retirada tardia dos pontos entre 14 a 20 dias e logo após iniciamos a corticoterapia intralesional profilática, sistematicamente em todos os casos, seguindo o mesmo esquema descrito previamente, porém com doses e volumes menores pela redução da massa

cicatricial. Na ausência de recidiva realizamos em média três sessões mensais, e posteriormente seguimento clínico. Frente a qualquer sinal de recidiva e reatividade da cicatriz como prurido, dor, hiperemia, endurecimento e crescimento ativo da lesão reiniciamos as aplicações. Mantemos o seguimento de cada paciente por três a cinco anos.

FIGURA 5. Excisão parcial intralesional de queiloide inativo em lóbulo de orelha direita justificado pelo tamanho extenso da lesão.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 6. Excisão total extralesional de queiloide inativo em região inguinal direita.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.5.3. TERAPIAS COMPLEMENTARES

As medidas complementares que descreveremos adiante são sugeridas em todos os casos acompanhados, como forma de aperfeiçoar e potencializar o tratamento das cicatrizes queloidianas. Dentre elas, destacamos a compressão mecânica externa. A aplicação de pressão externa sobre a cicatriz atua como medida coadjuvante principalmente em cicatrizes de pós-operatório de ressecção de queloides. Ela previne o crescimento cicatricial excessivo, otimizando as aplicações de triancinolona. Quando aplicada diretamente sobre o quelóide, seja ele ativo ou inativo, possui pouco resultado. Utilizamos, portanto, como profilaxia de recidiva no pós-operatório. Essa compressão pode ser feita através de placas de silicone, malhas compressivas, placas de elastômeros ou brincos de pressão. Infelizmente não possuímos o controle preciso da pressão aplicada por cada material, então utilizamos de forma empírica. O que observamos foi que materiais com maior rigidez, mas ainda com passível de moldar, possuíam uma ação mais eficiente do que materiais mais finos e maleáveis como a placa de silicone.

A microporagem para redução da tensão das bordas da ferida também representa uma medida auxiliar no pós-operatório de excisão de queloides, principalmente quando localizados em dorso, tórax, abdome e membros. É realizada com micropore fino em “x”, e trocada a cada cinco-sete dias, e mantida primordialmente no primeiro mês de pós-operatório.

Outro tratamento coadjuvante é a hidratação tópica da cicatriz, o que previne o ressecamento e descamação da mesma, fato que reduz o prurido e o ato de coçar. Utilizamos desde gel de silicone (kelocote®, skinmatix®), como óleos hidratantes a base de ácidos graxos essenciais (dersani®, biooil®), como outras medicações tópicas como ckderm ®, bepantol ®, todas com o mesmo objetivo.

FIGURA 7. Aplicação de compressão mecânica com placa de silicone em pós-operatório de excisão de quelóide, medida adjuvante para profilaxia de recidiva.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.6. COLETA DO MATERIAL

A coleta do material foi realizada no ambulatório de quelóide, nas salas de pequenas cirurgias. Foi realizada marcação da lesão com caneta cirúrgica, e após a anestesia local com lidocaína 2% foi realizado exérese cirúrgica da cicatriz, e posterior sutura primária, sem tensão, em uma única camada. Enquanto que, para a coleta das cicatrizes normotróficas, foi realizada excisão de cicatriz de cesariana prévia em pacientes multíparas no parto subsequente, ou então coleta de cicatrizes de pacientes que seriam submetidos à reabordagem cirúrgica ou correção de cicatriz, em geral pacientes submetidas a cirurgias estéticas prévias. Uma parte do fragmento da cicatriz ressecada, tanto quelóideana quanto normal, foi armazenada em RNA *later* para futura realização de reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (qPCR).

3.7. EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração do RNA total utilizou-se o kit de extração de RNA (RNA SV Total RNA Isolation System, Promega, Madison, Wisconsin - EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Fragmentos de tecidos, armazenados em RNA *later* (Invitrogen, Vilnius - Lituânia), foram processados por maceração mecânica com o aparelho *tissue tearor*, transferidos para tubo *eppendorf* contendo tampão de lise e misturados por inversão. Adicionou-se 350µl de tampão de diluição e as amostras foram aquecidas em banho-maria a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 10 minutos a 13000xg à 4°C. Após esta centrifugação transferiu-se o sobrenadante para novos tubos *eppendorfs* e adicionado 200µl de etanol a 95%. Transferiu-se o material para um conjunto de separação do kit, contendo uma membrana, sendo posteriormente centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. O RNA foi lavado com 600µl de solução de lavagem de acordo

com as especificações do fabricante (*RNA Wash Solution*) por 1 minuto e centrifugado (13000xg à 4°C). Eliminou-se a presença de DNA contaminante através do tratamento com DNase por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação adicionou-se 200µl de solução de *DNase stop* e o material foi centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. Lavou-se novamente o material por 2 vezes com *RNA Wash Solution* com posterior centrifugação por 1 minuto a 13000xg à 4°C. Transferiu-se a membrana separadora contendo o RNA para outro tubo, adicionou-se 30µl de água livre de nucleasse e realizado centrifugação por 1 minuto a 13000xg à 4°C. Após estes procedimentos, o RNA obtido foi eluído em 30µl de água deionizada e livre de RNase, para quantificação e confecção de DNA complementar (cDNA).

3.8. CONFECÇÃO DE cDNA

Confeccionou-se o cDNA a partir de 1 µg de RNA, 0,5 µg de Oligo dT (Promega, Madison, Wisconsin - EUA) e água ultra pura (Milli-Q) autoclavada encaminhado para o termociclador para um ciclo de 5 minutos a 70°C. Após resfriamento imediato, adicionou-se dNTP (2,5mM), transcriptase reversa M-MLV RT (Improm II, Promega, Madison, Wisconsin - EUA) e tampão para reação M-MLV-5x Buffer (Promega, Madison, Wisconsin - EUA). Novamente, a reação foi levada ao termociclador para mais um ciclo de 1 hora à 42°C, seguido de 3 minutos a 10°C. No final, adicionou-se ao cDNA confeccionado 75µl de água ultra pura autoclavada, sendo estas amostras congeladas em seguida a -20°C, até o momento de uso.

3.9. REAÇÕES DE PCR QUANTITATIVO (qPCR)

A expressão quantitativa de RNAm dos genes TGF-β, FGF, IL-33, IL-22, ARG-1, ARG-2, VIP, VIP-R1, TAC1, TAC-R1, INOS foram analisadas por reações de PCR em tempo real, nas amostras de cDNA de fragmento pele com queiloide e cicatriz controle. Foram utilizados *primers* e sondas do sistema *Taqman* (*Applied Biosystems* – EUA) no aparelho de PCR em tempo real *StepOnePlus* (*Applied Biosystems* – EUA) com *primers* adequados para tais reações e utilizando a β-actina como controle. **(Anexo D)** O cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado de acordo com as instruções do

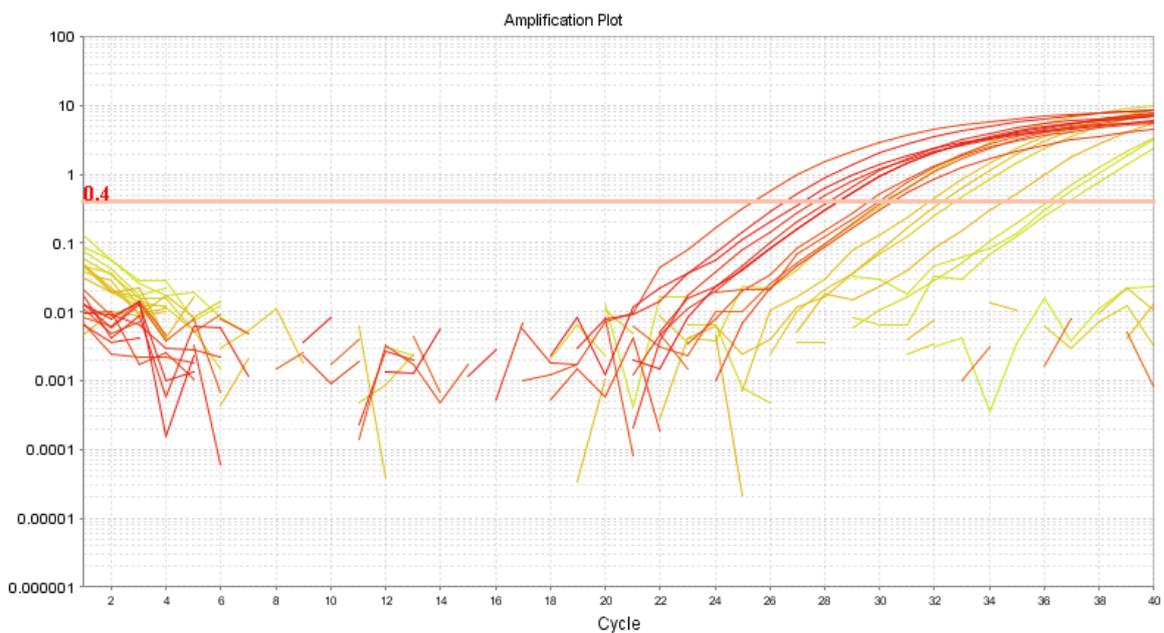
fabricante. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar) e a fórmula aritmética para alcançar a quantificação relativa foi $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (treated) - Ct (control)$. (LIVAK, 2001)

FIGURA 8. Aparelho de PCR em tempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems – EUA).

Fonte: Applied Biosystems (www.thermofisher.com)



FIGURA 9. Curva de amplificação dos ciclos de PCR para cDNA da ARG-1 e β -actina, incluindo grupo de queloides e grupo controle.



Fonte: Aparelho de PCR em tempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems – EUA)

Linha laranja: linha de corte CT=0,4. Linha vermelha: β -actina (controle). Linha amarela: arginase 1.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Statview* (Abaccus - EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis apresentaram distribuição ou variância não homogênea, foram expressas em mediana com valores mínimo e máximo e percentis e analisadas por métodos não paramétricos pelos testes de Mann-Whitney. A correlação entre duas variáveis contínuas com distribuição não normal foi analisada pelo teste de Spearman (r_s). Para comparar duas variáveis contínuas nos mesmos pacientes foi aplicado o teste de Wilcoxon (U). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

3.11. NORMAS PARA A CONFECÇÃO DO MANUSCRITO

Para a elaboração escrita do trabalho, foi consultado o manual para apresentação de trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) organizado pela biblioteca universitária da UFTM.

4- RESULTADOS

Foram avaliadas 98 biópsias, sendo 53 de pacientes com que-loide e 45 cicatrizes normais. A idade dos pacientes portadores de que-loide variou de 11 anos a 73 anos, com média de idade de 28 anos. Enquanto que, no grupo controle, a variação de idade foi de 13 anos a 56 anos, com média de 30 anos. Nos pacientes com cicatrizes que-loideanas houve predominância do gênero feminino com 58,5% e 64,15% dos pacientes pertenceram à etnia negra. A localização mais comum do que-loide foi no lóbulo da orelha devido a perfuração de *piercing*/brinco, em 73,6% dos casos. (Tabela 1)

TABELA 1. Características gerais e clínicas dos pacientes portadores de que-loide.

Total de biópsias	53
Média de Idade	28 anos
Gênero feminino	31 (58,5%)
Etnia negra	34 (64,15%)
Localização do que-loide	
Lóbulo orelha (perfuração por brinco ou <i>piercing</i>)	39 (73,6%)
Tórax	6 (11,3%)
Abdome	6 (11,3%)
Cervical	2 (3,7%)
Queloides em atividade	47 (88,6%)

Dos 53 pacientes portadores de que-loide apenas seis pacientes (11,3%) apresentavam à admissão lesões inativas, e, portanto, foram submetidos inicialmente à cirurgia de excisão extralesional e posterior corticoterapia intralesional profilática (três sessões com intervalos mensais) e todos, até o momento, sem recidiva. A amostra tecidual

desses pacientes não apresentou interferência do uso de triancinolona. Já, os 47 pacientes restantes (representando a maioria de 88,6% dos casos tratados) possuíam queloides ativos e, portanto, foram conduzidos à aplicação intralesional de corticoide como tratamento inicial antes da excisão cirúrgica, com número de sessões variando individualmente de três a doze conforme a resposta terapêutica. Observa-se assim que quase 90% das amostras de tecido obtidas para análise de citocinas foram submetidas a depósitos de triancinolona pré-operatórios, fator que futuramente poderá interferir nos resultados da expressão de certas citocinas relacionadas ao processo inflamatório e que podem ter sido moduladas pelo corticoide, fato não desprezível.

FIGURA 10. Paciente com queiloide inativo em orelha esquerda, submetida à excisão extralesional, seguida por três sessões de corticoterapia, sem recidiva após 18 meses.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 11. Paciente com queiloide em orelha esquerda. Realizada três sessões de corticoide intralesional, seguida por cirurgia extralesional e corticoide pós-operatório (cinco sessões), sem recidiva após 12 meses.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 12. Paciente com queiloide em cicatriz de cesariana, realizado três sessões de corticoide intralesional seguida por cirurgia extralesional e triancinolona pós-operatória (duas sessões), sem recidiva após seis meses.



Fonte: Arquivo pessoal.

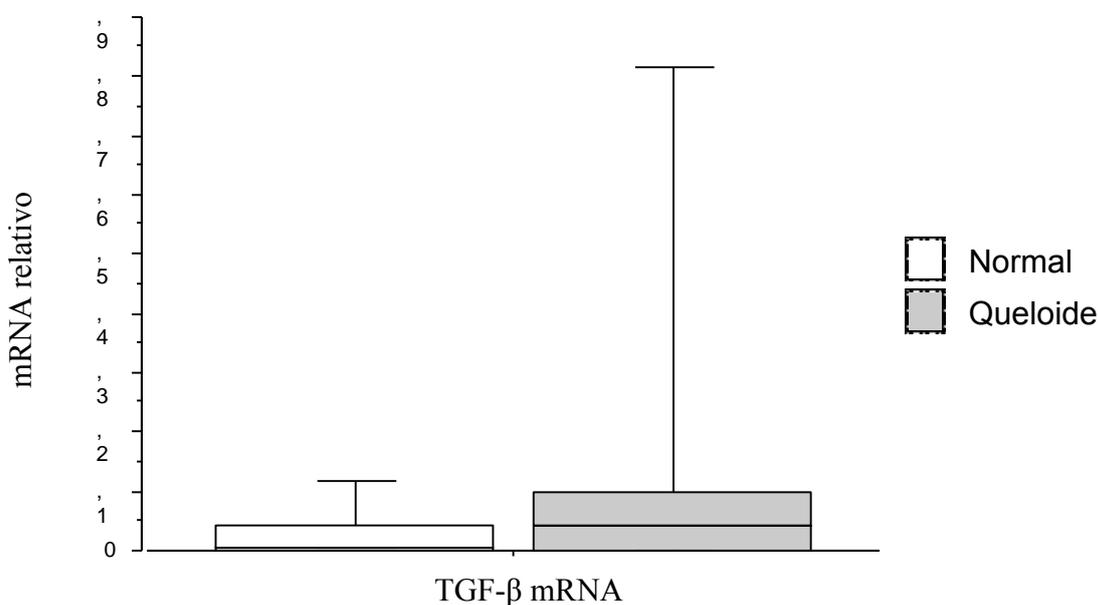
FIGURA 13. Paciente com múltiplos queloides, de difícil tratamento. Proposto corticoide intralesional (12 sessões) seguido por ressecções cirúrgicas intralesionais parceladas, devido à extensão das lesões, e triancinolona pós-operatória, com grande tendência à recidiva. Mantem aplicação mensal de corticoide para estabilizar crescimento das lesões. Em seguimento há 24 meses.



Fonte: Arquivo pessoal.

Quando avaliamos a expressão do RNAm relativo para o TGF- β encontramos um resultado significativamente maior para o grupo de queloides quando comparado ao grupo de cicatrizes normais (Mann-Whitney; $p=0,0121$), com mediana de 0,041 (IQR=0,097) para os queloides e mediana de 0,007 (IQR=0,043) para os controles. (Figura 14)

FIGURA 14. Análise da expressão de cópias de RNAm para o TGF- β .



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

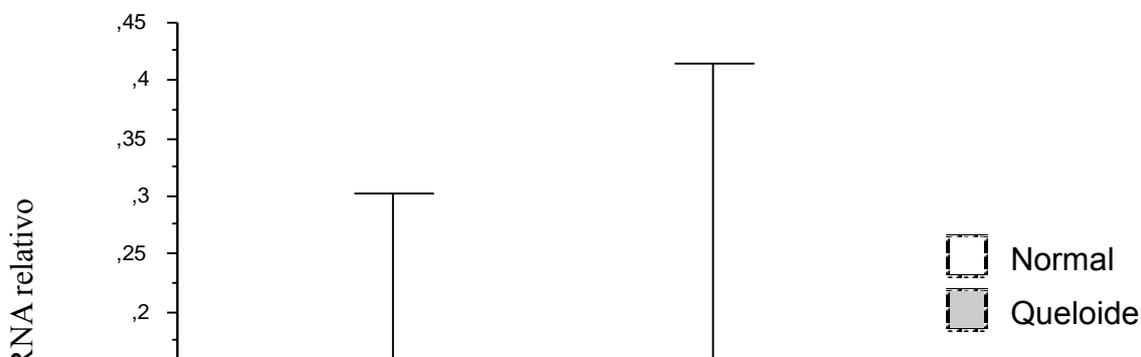
Número de amostras grupo controle 39 e queloides 44.

Expressão do RNAm do TGF- β em biópsias de pacientes com queloide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p<0,05$.

Em relação à análise do número relativo de cópias de RNAm da IL-33, observou-se que os pacientes com queloide apresentaram um maior número relativo de cópias de mRNA quando comparados aos controles, porém sem diferença estatística (Mann-Whitney; $p=0,2727$). (Figura 15)

FIGURA 15. Análise da expressão de cópias de RNAm para IL-33.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

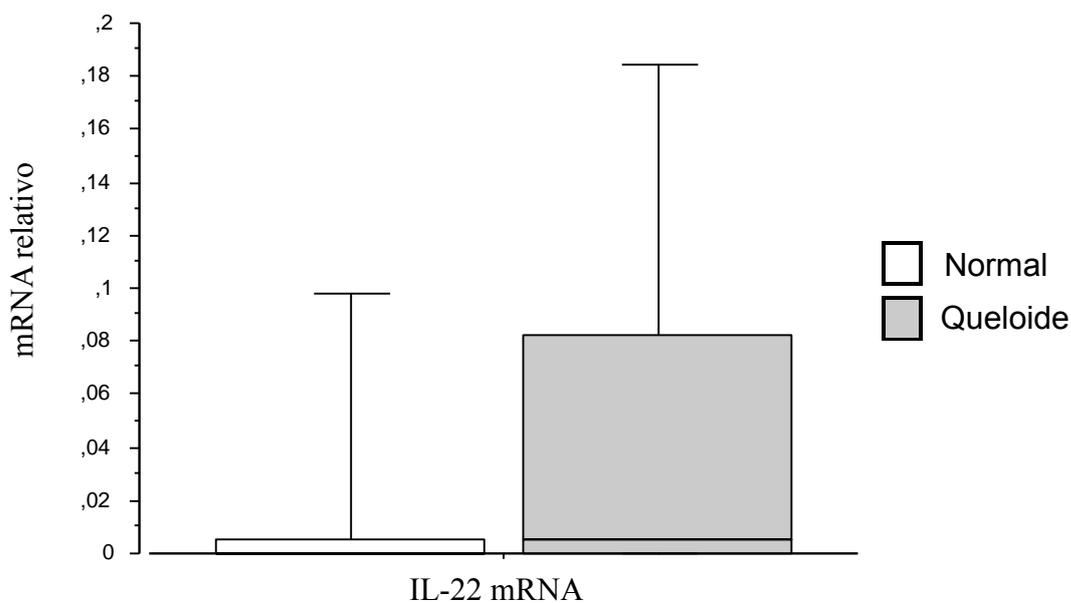
Número de amostras grupo controle 23 e queloides 21.

Expressão do RNAm de IL-33 em biópsias de pacientes com queleide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

O número de cópias relativas de RNAm para IL-22 foi significativamente maior nos pacientes com queleide quando comparados aos controles (Mann-Whitney; $p = 0,0211$) com mediana de 0,005 (IQR=0,082) para os queloides e mediana de 0,000 (IQR=0,005) para os controles. (Figura 16)

FIGURA 16. Análise da expressão de cópias de RNAm para IL-22.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

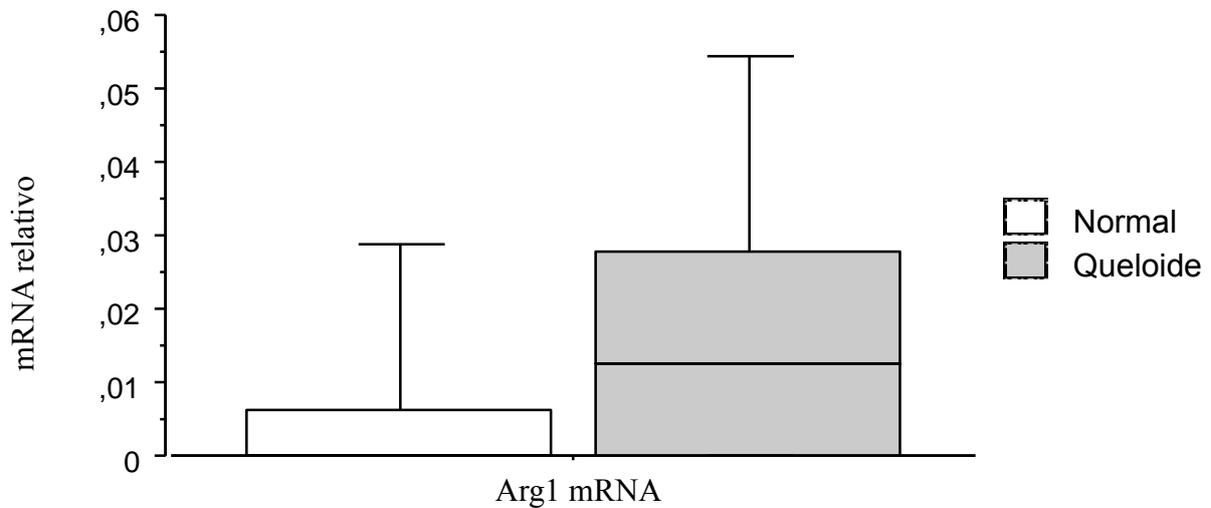
Número de amostras grupo controle 27 e queloides 32.

Expressão do RNAm de IL-22 em biópsias de pacientes com que-loide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

A expressão de RNAm para ARG-1 foi significativamente maior nos pacientes com que-loide quando comparados ao grupo controle (Mann-Whitney; $p = 0,0115$), com mediana de 0,013 (IQR=0,028) para os queloides e mediana de 0,000 (IQR=0,006) para os controles. (Figura 17)

FIGURA 17. Análise da expressão de cópias de RNAm para ARG-1.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

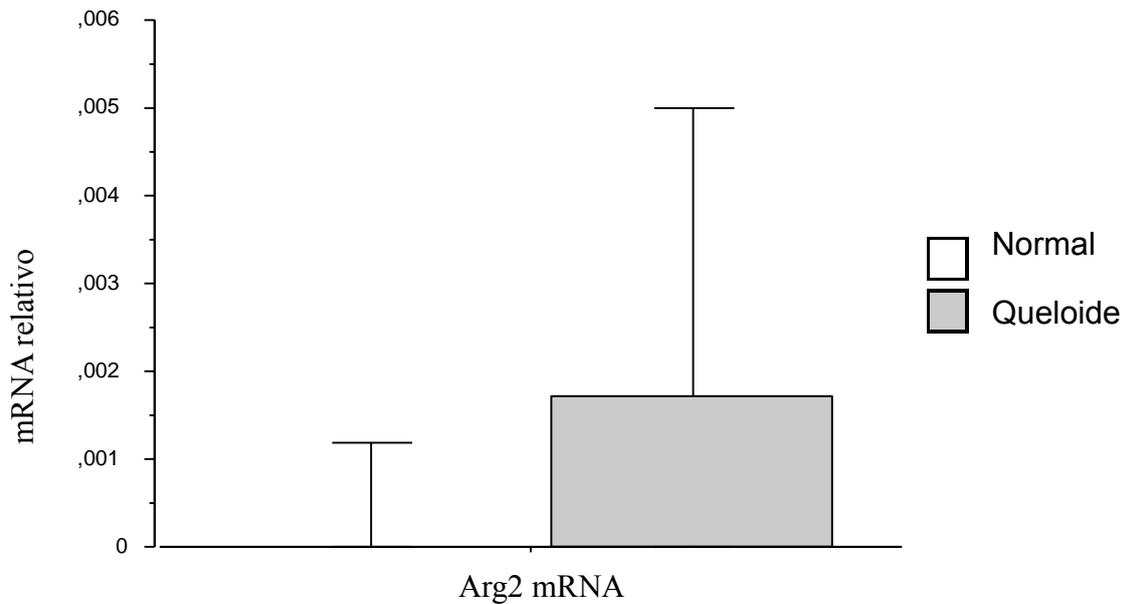
Número de amostras grupo controle 23 e queloides 23.

Expressão do RNAm de ARG-1 em biópsias de pacientes com queiloide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

Ao analisar o número relativo de cópias de RNAm para ARG-2, apesar de maior expressão de RNAm no grupo das cicatrizes queiloideanas, não houve diferença significativa entre os pacientes com queiloide e controle quando comparados entre si (Mann-Whitney; $p = 0,1436$). (Figura 18)

FIGURA 18. Análise da expressão de cópias de RNAm para ARG-2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

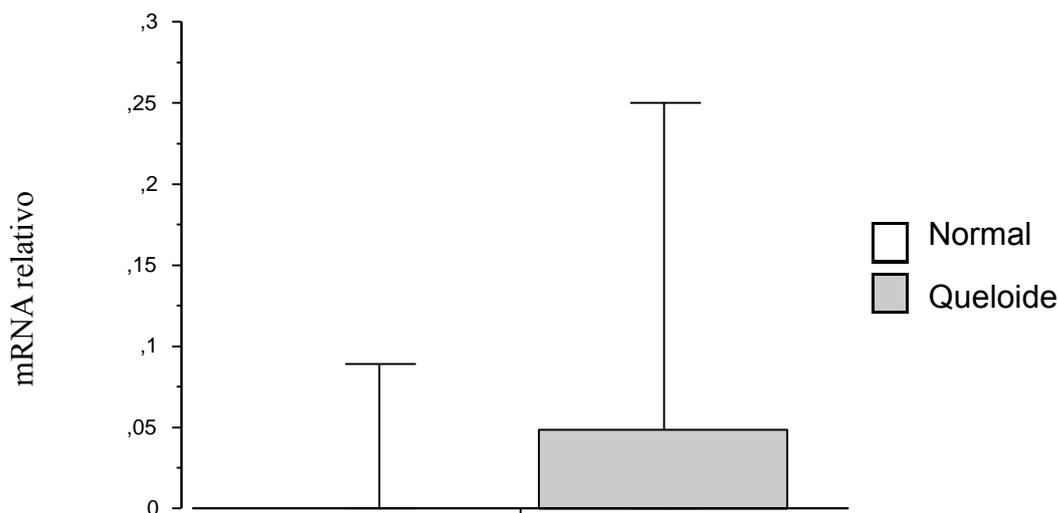
Número de amostras grupo controle 23 e queloides 23.

Expressão do RNAm de ARG-2 em biópsias de pacientes com queiloide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

Em relação à análise do número relativo de cópias de RNAm do VIP-R1, observou-se que os pacientes com queiloide apresentaram um maior número relativo de cópias de RNAm quando comparados aos controles, porém sem diferença estatística (Mann-Whitney; $p = 0,2565$). (Figura 19)

FIGURA 19. Análise da expressão de cópias de RNAm para VIP-R1.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018. **VIP-R1mRNA**

Número de amostras grupo controle 34 e queloides 39.

Expressão do RNAm de VIP-R1 em biópsias de pacientes com queiloide comparadas com o grupo controle de cicatrizes normais.

A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% (IQR) e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

Um expressivo número de pacientes e controles não apresentaram amplificação para cDNA de FGF, VIP, TAC1, TAC-R1 e iNOS. A expressão de RNAm dessas substâncias variou de 2% a 13% dos casos analisados, não havendo diferença significativa entre os pacientes com queiloide quando comparados ao grupo controle. (Tabela 2)

TABELA 2. Expressão de RNAm relativo à FGF, VIP, TAC, TAC-R1 e iNOS.

Alvo	Queloide detectado	Queloide Não detectado	Controle detectado	Controle Não detectado	Número total de amostras
FGF	02 (4,4%)	43	01 (1,9%)	51	97
VIP	06 (13%)	40	02 (5,2%)	38	86
TAC1	06 (13%)	40	04 (10%)	36	86
TAC-R1	01 (2,2%)	45	01 (2,5%)	39	86
iNOS	03 (9%)	30	01 (3,2%)	30	64

5- DISCUSSÃO

Do total de 98 pacientes avaliados, sendo 53 pacientes com quelóide, notamos que a média de idade dos pacientes portadores de quelóide no presente estudo foi de 28 anos, com predominância do gênero feminino (58,5%) e na etnia não branca (64,15%), e a localização mais comum do quelóide foi no lóbulo da orelha devido a perfuração de *piercing*/brinco (73,6%). Semelhante aos nossos resultados, a literatura mostra que pacientes com quelóide apresentam média de idade entre 24 anos e 35,7 anos e o aparecimento destas lesões ocorrem entre 11 anos e 40 anos de idade. (FURTADO; HOCHMAN; FERREIRA, 2012; LANE; WALLER; DAVIS, 2005; TANAYDIN et al., 2016) Sugere-se que essa faixa etária está associada principalmente a alterações de hormônios sexuais, além de maior exposição a traumas e a perfurações, tais como brincos/*piercings*, e também, uma maior prevalência durante a gravidez, ainda devido a modificações hormonais. (KIM et al., 2013; SCHIERLE; SCHOLZ; LEMPERLE, 1997; SHAMSI MEYMANDI; REZAZADEH; EKHLASI, 2014)

Em nosso estudo, houve prevalência da etnia não branca, o que também condiz com a literatura. A influência do Hormônio Melanotrófico ou Melanotrofina fica clara quando avaliamos a prevalência em pacientes afrodescendentes, ou com descendência negra, e a inexistência de quelóides em albinos. Outros estudos têm sido feitos para comprovar a presença de fatores genéticos decorrentes da hereditariedade familiar e da frequência em populações étnicas específicas. A análise de possíveis polimorfismos genéticos que determinam a predisposição à cicatriz quelóideana têm sido alvo de estudos recentes e vislumbram avanços nesse sentido. (BROWN et al., 2008; HOCHMAN, B., LOCALI, R. F., OLIVEIRA, L. Q. R., FERREIRA, L. M., 2004)

Quase 90% dos pacientes com quelóide possuíam cicatrizes em atividade, e, portanto, foram conduzidos à aplicação intralesional de corticoide antes da excisão cirúrgica, e profilaticamente após a cirurgia. Conforme a aplicação do protocolo sugerido por este estudo, apresentamos índice de recidiva de 15%, equiparados ao tratamento até então considerado padrão, da associação de cirurgia e betaterapia. Ressalta-se, enfim, a importância da definição da atividade cicatricial antes da instauração do tratamento, além do uso de corticoide antes e após a cirurgia nas lesões ativas, e sempre que possível margem cirúrgica justa ou extralesional, fatos responsáveis pelos melhores resultados e

baixa recorrência. (CARVALHAES et al., 2015; HOCHMAN, B. et al., 2008; TAN et al., 2010)

As citocinas e fatores de crescimento estudados nessa pesquisa já foram relatados como participantes em processos inflamatórios em geral, algumas delas já descritas no processo de cicatrização de feridas, outras com presença marcante em queratinócitos, fibroblastos e outras células da pele. Após extensa revisão de literatura, foram escolhidas para o presente estudo citocinas já conhecidas pela associação à ativação de fibroblastos como TGF- β e FGF, e outras que possam ter relação com a fisiopatogenia dos queloides, mas ainda hipotética, associação ainda não descrita na literatura, como IL-33, IL-22, ARG-1 e 2, iNOS, TAC e VIP.

O estudo mostrou que a expressão de RNAm para TGF- β , IL-22 e ARG-1 foi significativamente maior de no grupo dos queloides, enquanto para IL-33, ARG-2 e VIP-R1, apesar de maior número de cópias de RNAm encontrado nos queloides, essa diferença não foi significativa.

Em nossos resultados, a expressão de RNAm para o TGF- β foi significativamente maior nos pacientes com queiloide quando comparados aos controles, estando de acordo com a literatura. Sabemos que o TGF-beta induz fibroblastos para sintetizar a matriz extracelular, esta citocina tem sido considerada um mediador central da resposta fibrótica. O TGF- β regula a proliferação e diferenciação celular, desempenhando importante papel na patogênese das cicatrizes patológicas hiperproliferativas. (LEROY; TROJANOWSKA; SMITH, 1990)

No queiloide foi encontrado excesso de produção e inadequada regulação da atividade do TGF- β . São três isoformas de TGF β (1, 2 e 3). TGF β 1 e 3 têm um papel crucial na fibrose, com TGF β 1 profibrótico e TGF β 3 antifibrótico. (EL-ALEEM, S. A., S. ABDELWAHAB, AND N. M. S. OSMAN, 2017) Nos queloides os fibroblastos aumentam os níveis de TGF- β 1 e TGF- β 2, e diminuem os níveis de TGF- β 3 em comparação com fibroblastos normais. O TGF- β 1 tem sido apontado como um importante fator de crescimento na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e esta citocina parece também inibir os mecanismos de apoptose, mantendo desta forma, estes miofibroblastos em atividade pró-fibrótica. Estudos demonstram ainda que, os fibroblastos isolados de queloides são mais sensíveis à ativação pelo TGF- β que fibroblastos de pele normais. (BETTINGER et al., 1996; KULASEKARAN et al., 2009) No entanto, estudos até o momento não identificaram quaisquer mutações ou

polimorfismos associados com queloides em qualquer um dos genes TGF- β . (BAYAT et al., 2002; BOCK et al., 2005)

TGF- β provoca deposição matricial em cultura de células mesenquimais, promovendo a expressão de genes da MEC e suprimindo a atividade de genes de metaloproteases. Por vários anos já se sabe que a indução do colágeno pelo TGF- β ocorre de forma imediata e inicial, exigindo a ação dos SMADS (proteína intracelular transdutora de sinal do fator de transformação do crescimento). A sinalização celular da família TGF- β ocorre através dos receptores transmembrana tirosina quinase e a via SMAD. Na verdade, foi mostrado que o SMAD 3 é essencial para a indução de matriz, como para indução de genes profibróticos. No entanto, SMAD 3 parece ser geralmente requerido em fibroblastos para a transcrição de resposta ao TGF- β . (CHEN et al., 1999; OVERALL; WRANA; SODEK, 1989; VARGA; JIMENEZ, 1986)

Após lesão cutânea, TGF- β é induzido rapidamente, em conjunto com a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, que por sua vez liberam mais TGF- β . Conseqüentemente, TGF- β está presente no fluido da ferida ao longo do processo de reparação tecidual. A expressão de receptores de TGF- β é elevada em fibroblastos de cicatrizes hipertróficas e de queloides. TGF- β induz síntese da MEC quando injetado de forma subcutânea em camundongos ou em câmaras metálicas implantadas nas costas de ratos. (CHIN et al., 2001; DIEZ-MARQUES et al., 2002; KANE et al., 1991; QUERFELD et al., 1999; SCHMID et al., 1998; WAHL et al., 1987)

Evidências adicionais que apoiam o papel pró-fibrótico de TGF- β *in vivo* mostram que a deficiência de TGF- β 1 em ratos durante a cicatrização de feridas em estágio tardio promove diminuição da re-epitelização e da deposição de colágeno. Estudos prévios enfatizam os possíveis desafios em relação ao uso de TGF- β como um alvo anti-fibrótico. Estratégias anti-TGF podem não ser apropriadas no tratamento de doenças fibrosantes crônicas, que se desenvolvem ao longo de muitos anos, mas podem ser úteis após incisões cirúrgicas na prevenção de hipertrofia cicatricial e quelóide em pacientes predispostos. (BOTTINGER; LETTERIO; ROBERTS, 1997; KULKARNI; KARLSSON, 1993)

Embora o TGF- β tenha sido conhecido como indutor da síntese de MEC e da contração por fibroblastos, a contribuição precisa desta proteína em doenças fibróticas ainda não está clara. Em parte, esta questão é devida à dificuldade em entender os principais eventos desencadeados por um fator de crescimento em uma cultura celular. Contudo, estudos futuros vislumbram um crescente conhecimento da complexidade dos controles celulares para melhorar ou reprimir a resposta pró-fibrótica do TGF- β , o que

pode ser usado como tratamento durante a cicatrização de ferimentos. (LEASK; ABRAHAM, 2004)

O número de cópias relativas de RNAm para IL-22 no estudo foi significativamente maior nos pacientes com quelóide quando comparados aos controles. Muitas semelhanças podem ser encontradas entre os processos de reparo que ocorrem na pele e aqueles que ocorrem em outros órgãos contendo epitélio, como o timo, fígado e intestino, onde IL-22 medeia sinalização para células epiteliais. Na pele, IL-22 é expressa após queimadura, além de estar elevada em pacientes com psoríase, promovendo inflamação dérmica. Alguns estudos descobriram que a sinalização de IL-22 é ativa em fibroblastos, e esses processos fisiológicos podem tornar-se patogênicos se a produção excessiva de matriz destruir a arquitetura normal do tecido e interferir com a função do órgão, originando cicatrizes patológicas. Esses dados definem funções da IL-22 anteriormente não identificadas no reparo da pele mediante interações entre o sistema imunológico e fibroblastos. Por conseguinte, estudos adicionais sobre o papel da IL-22 em condições caracterizadas por cicatrização anormal de feridas e doenças fibróticas são necessários. (MCGEE et al., 2013, WOLK et al., 2004; WOLK et al., 2006)

Além disso, a IL-22 induz a migração de queratinócitos em um modelo de lesão *in vitro* e regula negativamente a expressão de pelo menos sete genes associados à diferenciação de queratinócitos. IL-22 induz hiperplasia da epiderme humana reconstituída e desempenha um papel importante em processos inflamatórios da pele. Investigações adicionais são necessárias para caracterizar o potencial regenerativo de IL-22 em condições fisiológicas e patológicas. Da mesma forma, estudos adicionais sobre mastócitos são válidos, porque um aumento do número de mastócitos epidérmicos é detectado em lesões psoriásicas e porque os mastócitos são conhecidos por produzirem IL-22. Em conjunto, esses dados ressaltam a importância da IL-22 na expressão de várias moléculas envolvidas no processo de proliferação e diferenciação do queratinócito humano. (DUMOUTIER; LOUAHED; RENAULD, 2000; JIANG et al., 2001)

A IL-22 promove sinalização celular através de um receptor de citocinas classe II composto por duas cadeias, a subunidade IL-22RA1 e a IL-10RB. Tal como acontece com a IL-10, a ligação de IL-22 ao seu receptor ativa a tirosina quinase JAK1 e Tyk2, levando à fosforilação de STAT3 e, em menor extensão, de STAT1 e STAT5. (KOTENKO et al., 2001; XIE et al., 2000) Além disso, descobriu-se que IL-22 induz a fosforilação de STAT3 em queratinócitos humanos. Experiências demonstraram

que a ligação tanto de IL-10RB quanto de IL-22RA1 são necessários para gerar a fosforilação ideal de STAT3. Curiosamente, uma inibição da fosforilação de STAT3 induzida por IL-22 foi obtida com IL-22RA2, o antagonista natural do receptor solúvel de IL-22. A expressão de IL-22RA2 não foi detectada nos queratinócitos, embora seja fortemente expresso em amostras de pele, sugerindo uma expressão por outras células da pele, que não queratinócitos. Essa discrepância pode ser de relevância biológica: embora IL-10 e IL-22 tenham funções biológicas muito diferentes, ambos têm a capacidade de ativar as tirosina-quinases JAK1 e Tyk2 e a fosforilação STAT3, além de vias específicas de sinalização. (XU et al., 2001) A sinalização da IL-22 pode estimular direta ou indiretamente a expressão de genes da MEC. Embora a IL-22 possa sinalizar via Jak /Vias STAT, MAPK e Akt, a maioria dos efeitos da IL-22 nas células epiteliais tem sido ligado ao STAT3. Portanto, é possível que a sinalização de IL-22 ative diretamente os promotores de fibronectina, colágeno III e colágeno I através de STAT3. Alternativamente, é possível que a IL-22 indiretamente regule a produção de MEC e a diferenciação do miofibroblasto. (LEJEUNE et al., 2002)

Recentemente, Wolk et al. relataram que a pele é um alvo para a IL-22. Além disso, uma expressão elevada de IL-22 foi detectada na pele de pacientes com dermatoses mediadas por células T. Associações entre membros da família IL-10 e a pele gerou indagações sobre os possíveis efeitos da IL-22 em queratinócitos humanos. (WOLK et al., 2004) O achado revelador da alta expressão de IL-22 nas cicatrizes queloidianas despertam futuros interesses para novos estudo.

A expressão de RNAm para ARG-1 foi significativamente maior nos pacientes com quelóide quando comparados ao grupo controle, condizente com os achados da literatura. O metabolismo de L-arginina mediada por Arginase produz L-ornitina, que é um componente importante da síntese de colágeno. (MORRIS, 2009) ARG-1 é expressa em uma variedade de tipos de células envolvidas na cicatrização de feridas, incluindo queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. (KAMPFER; PFEILSCHIFTER; FRANK, 2003) ARG-1 regula a síntese do aminoácido prolina, que é necessário para a produção de colágeno. Numerosos estudos sugerem que ARG-1 está criticamente envolvido na regulação de cicatrização de feridas e fibrose. No entanto, a função específica de ARG-1 permanece inexplorada. (LOKE et al., 2007; ZHAO et al., 2008) Estudos anteriores mostraram que a administração de L-arginina é capaz de promover a cura aguda em roedores e humanos, (WILLIAMS; ABUMRAD; BARBUL, 2002) um

efeito atribuído ao aumento produção de óxido nítrico através do metabolismo da L-arginina. (SHI et al., 2000)

Dados de estudos em animais sugeriram que o metabolismo da arginina ocorre durante a cicatrização de feridas. Além disso, suplementação de arginina em animais e humanos parece melhorar o reparo da pele. Contudo os mecanismos subjacentes a este efeito permanecem não identificados. A arginase regula poliaminas e a síntese de prolina através da produção de ornitina, e, além disso, regula a formação de NO através da concorrência de substrato. (CHANG; LIAO; KUO, 1998; ZHANG et al., 2001)

Estudos *in vitro* mostraram regulação positiva de ARG-1 durante cicatrização normal da ferida. Porém, estudos em humanos que abordaram o papel das arginases durante cicatrização de feridas são limitados. Eles descreveram a superexpressão de arginase em estados patológicos da ferida (por exemplo, diabetes, psoríase e úlceras). Cirurgia e sepse são conhecidas por induzir níveis elevados níveis de ARG-1. (BRUCHGERHARZ et al., 2003; OCHOA et al., 2001)

Ao analisar o número relativo de cópias de RNAm para ARG-2, não houve diferença significativa entre os pacientes com quelóide e controle. Na verdade, a literatura mostra que a ARG-2 atua de forma prevalente na cicatrização normal, enquanto ARG-1 é mais importante em cicatrizes patológicas da pele, o que pode trazer importantes consequências terapêuticas, através da inibição de ARG-1 e estimulação de ARG-2 em feridas patológicas. (WOHLRAB; SIEMES; MARSCH, 2002) A ARG-2 atua principalmente na produção de ornitina como um precursor de prolina e glutamato. (LI et al., 2001) Atualmente, não temos uma explicação para os níveis elevados de ARG-2 em plasma e fluidos de feridas. Curiosamente observamos coexpressão de ARG-1 e ARG-2 em PMNs, em todos os momentos pós-ferimentos, enquanto nenhuma expressão foi visto em PMNs de pele normal. (MUNDER et al., 2006) Jacobsen sugeriu que a função de liberação de arginase de PMNs é para reduzir a formação de NO por macrófagos, endoteliais e células T. Outra descoberta interessante é que apenas observamos expressão de ARG-2 em macrófagos após lesão. A expressão de arginase por macrófagos parece ser espécie e célula específicos, visto que macrófagos murinos expressam ARG-1 e ARG-2, macrófagos de ratos ARG-1 e células mieloides humanas expressam ARG-1. (JACOBSEN et al., 2007) Gotoh sugeriu a expressão precoce e tardia da arginase em macrófagos: primeiro ARG-2 para produzir poliaminas para

macrófagos em crescimento e diferenciação e, mais tarde, ARG-1 para produzir ornitina para produção de colágeno. (GOTOH; MORI, 1999)

Alternativamente, diferentes isotipos de arginase podem desempenhar papéis durante a cura normal e patológica. Achados comparáveis foram observados em fibroblastos, expressando apenas ARG-2 por lesão. Em ratos, foi detectada uma *up-regulation* apenas de ARG-1 em fibroblastos após o ferimento para fornecer substrato para síntese de colágeno e proliferação celular. (WITTE et al., 2003; XU et al., 2004)

A contribuição da arginase para a cura de feridas permanece obscura. Um estudo revelou que a inibição farmacológica da atividade da arginase afetou diretamente a cicatrização. A expressão reduzida de arginase se correlaciona diretamente com a cicatrização de feridas e, como tal pode representar um importante alvo terapêutico futuro. (CAMPBELL et al., 2013) Portanto, a literatura revela uma associação de ARG-1 com cicatrizes patológicas e ARG-2 com cicatrizes normais, condizente com os achados da nossa pesquisa, que mostrou uma expressão significativamente elevada de ARG-1 para os queloides, mas uma expressão não significativa de ARG-2.

No presente estudo, não encontramos diferença significativa no número relativo de cópias de RNAm para IL-33 nos grupos estudados. A IL-33 pode ser encontrada em queratinócitos da pele, células epiteliais e endoteliais, e pode atuar na cicatrização de feridas, mas sem clara associação com queloides. Enquanto IL-1 é processado e liberado por células imunes vivas em resposta à infecção ou outros gatilhos, IL-33 é liberado principalmente como um sinal de perigo por células danificadas. Estudos defendem o papel da IL33 em promover a cicatrização de feridas através do reparo epitelial precoce. (WANG, S. et al.;2012) IL-33 pode também ser liberada por mastócitos ativados com ações autócrinas e parácrinas. IL-33 aumenta os efeitos estimuladores da IgE e da substância P nos mastócitos, mas também pode desencadear liberação de citocinas por conta própria. Os níveis de IL-33 no sangue são aumentados na asma, dermatite atópica, esclerose múltipla, artrite reumatóide e síndrome de Sjögren. No entanto, elevação prolongada de IL-33 pode ser protetora na aterosclerose, sugerindo diferentes papéis em doenças imune-reguladas. (CHRISTOPHI et al., 2012; WANG, S. et al., 2012)

IL33 primariamente induz a formação de citocinas Th2 mas também pode ativar células CD8+. No entanto, parece que o tipo de citocina induzida pela IL-33 pode depender particularmente do tecido alvo, uma vez que a extensão e o tipo de tais mediadores variam entre os tecidos. (SAVINKO et al., 2013) IL33 foi considerada o

principal ligante do receptor IL-1R4, que é expresso majoritariamente na superfície de células epiteliais, fibroblastos e mastócitos. (LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010)

A IL-33 tem sido cada vez mais implicada na imunopatologia e inflamação. Níveis de sangue de IL-33 são aumentados em uma série de doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus sistêmico eritematoso, síndrome de Sjögren, doença de Graves e doença inflamatória intestinal. IL-33 tem um papel descrito na cicatrização de feridas e sob processos de inflamação cutânea se comunicam com neurônios sensoriais desencadeando prurido. Esses dados demonstram um papel anteriormente não reconhecido para um eixo IL-33 na regulação das interações das células imunes epiteliais necessárias para a restauração da barreira cutânea após ferimentos. (GALIANO et al., 2004; TANIGUCHI et al., 2013)

Alguns estudos testaram diretamente o papel de IL-33 em níveis cutâneos na cicatrização de feridas após ferimento dérmico de espessura total. Demonstraram que a expressão de IL-33 está elevada após ferimento cutâneo em camundongos e humanos. Na ausência de IL-33, a cicatrização de feridas foi significativamente prejudicada enquanto a presença de IL-33 promoveu re-epitelização e fechamento de feridas. Juntos, esses dados demonstram um papel anteriormente não reconhecido para um eixo IL-33 na regulação das interações das células imunes epiteliais necessárias para a restauração da barreira cutânea após ferimentos. (GALIANO et al., 2004; RAK et al., 2016) Porém, até o momento não existe associação clara entre IL-33 e quelóide, mais estudos são necessários.

Os níveis de VIP neste estudo não foram detectáveis, e, portanto, nenhuma conclusão pode ser inferida sobre sua associação com quelóides. O peptídeo vasoativo intestinal (VIP) é um neuropeptídeo que pertence à superfamília do glucagon/secretina, primeiramente identificado por Said e Mutt há 30 anos, foi originalmente isolado como um vasodilatador. Com o tempo, evoluiu cientificamente de um hormônio para um novo agente capaz de modificar a função imune e possivelmente uma molécula semelhante à citocina. (DELGADO; POZO; GANEA, 2004)

De acordo com a literatura, questiona-se se o VIP poderia ser considerado uma citocina. O termo citocina define uma proteína secretada por leucócitos (e outros tipos de células) em resposta à lesão ou reparo tecidual, atuando predominantemente em um local, parácrino ou autócrino com ações pleiotrópicas, incluindo efeitos sobre células imunes e modulação da resposta inflamatória. Sendo assim, VIP claramente compartilha essas

características e poderia ser considerada uma citocina, além de um neuropeptídeo. Embora este atual conceito seja necessariamente amplo e multidisciplinar, pode-se antecipar uma interface ainda maior com outras patologias no futuro, inclusive sua associação com patologias cicatriciais. (DELGADO et al., 2002)

VIP foi classificado pela primeira vez como um hormônio intestinal porque foi isolado a partir do trato digestivo e desempenha um papel na secreção de eletrólitos no trato intestinal, mas foi posteriormente encontrado como um neurotransmissor em vários tecidos. VIP exerce uma gama ampla de atividades, como imunológica e neuroprotetora. (DICKSON; FINLAYSON, 2009)

A pele é um órgão densamente innervado e estudos sugerem claramente que o sistema nervoso cutâneo e seus neuromediadores desempenham um papel importante na homeostase da pele e durante todas as fases de cicatrização de feridas. Destaca-se o fato de que o desequilíbrio dos neuromediadores encontrados em doença com desnervação, como diabetes, causa retardo e prejuízo na cicatrização. Os nervos sensoriais na pele são capazes de liberar neuromediadores como neuropeptídeos que sinalizam para a pele. Os neuropeptídeos são uma família de mensageiros extracelulares, que atuam como neurotransmissores, hormônios ou fatores parácrinos. Numerosos neuropeptídeos são liberados pela inervação cutânea sensorial e autonômica, incluindo substância P e o VIP. Além disso, próprias células, como queratinócitos, células endoteliais, células de merkel, fibroblastos ou leucócitos são capazes de liberar neuropeptídeos. A presença de neuropeptídeos em terminações nervosas livres e a proximidade dessas terminações com uma variedade de células na pele parecem associar o nervo cutâneo a outras ações biológicas, com destaque para a cicatrização de feridas. (ANSEL et al., 1996; HOLZER, 1988; LEMBECK; HOLZER, 1979; LEUNG; WONG, 2000; SCHAFFER, M. et al., 1998; WANG, H. et al., 2002)

VIP é considerado um peptídeo neural e endócrino. Mais evidências emergentes comprovam que a inervação cutânea desempenha um papel importante na cicatrização de feridas. Ashrafi et al. em 2016 analisou a evidência do papel da inervação da pele durante os estágios de cicatrização de feridas cutâneas. Numerosos neuropeptídeos que são secretados por fibras nervosas sensoriais e autonômicas são uma parte essencial durante distintas fases da cicatrização. A compreensão dos mecanismos através dos quais a inervação cutânea modula a cicatrização de feridas no adulto e no feto irá fornecer oportunidades para desenvolver dispositivos terapêuticos que poderia manipular a inervação da pele para auxiliar a cicatrização de feridas. O VIP pode ser envolvido na re-

inervação do tecido ferido, pois se demonstrou promover a regeneração do nervo ciático em rato após sua transecção. (ASHRAFI; BAGUNEID; BAYAT, 2016; GONZALEZ et al., 1997; RAYAN et al., 1995; WOLLINA, 1993) A constatação do retardo na cicatrização da pele desnervada destaca a importância da inervação cutânea no reparo de feridas, fato investigado experimentalmente em modelos humanos e animais e também observado clinicamente. (GONZALEZ et al., 1997; WOLLINA, 1993)

Em relação à análise da expressão do VIP-R1, observou-se que os pacientes com queiloide apresentaram um maior número relativo de cópias de RNAm quando comparados aos controles, porém sem diferença estatística.

Achados da literatura são pobres no que se refere à associação de receptores de VIP e cicatrizes patológicas. O receptor do VIP (VIP-R1) pertence ao grupo B da família GPCR (receptores transmembrana acoplados à proteína G) e consiste em 437 - 459 resíduos de aminoácidos com um domínio N-terminal extracelular de cadeia longa. De acordo com a IUPHAR (União Internacional de Farmacologia) os mamíferos têm 2 subtipos de receptores de VIP (VPACs), nomeadamente, VPAC1 e VPAC2. O VIP é distribuído em altas concentrações no trato digestivo e sistema nervoso. Já, a distribuição de VPAC1 e VPAC2 tem sido extensivamente analisada. VPAC1 é expresso no fígado, pulmões, rins, próstata, glândulas mamárias, baço, linfócitos, mucosa do estômago e intestino delgado, e muitos outros tecidos. VPAC2 é expresso em grandes quantidades no músculo liso de órgãos e vasos paredes e também é observado na mucosa do intestino grosso, células foliculares da tireóide, medula supra-renal, retina e alvéolo epitélio. VPAC2 também é expresso em linfócitos e macrófagos após infecções bacterianas ou virais. (REUBI et al., 2000)

As taquicininas e seu receptor não tiveram níveis de expressão detectáveis por esse estudo. A substância P, o principal membro da família das taquicininas e mais importante na pele, recebeu essa denominação por parte de seus descobridores meramente devido à forma como era extraída, em pó (do inglês *powder*). É um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos, sendo 100 vezes superior à histamina em idênticas concentrações molares. Ela é encontrada nas fibras da derme e epiderme, glândulas sudoríparas, em corpúsculos de Meissner, nervos perivasculares e células de Merkel. Pode, ainda, ser sintetizada em células do sistema imune, como monócitos, mastócitos e eosinófilos. A substância P é um neurotransmissor composto por uma cadeia de 11 aminoácidos que atua como neuromodulador, e facilita processos inflamatórios, ansiedade e nocicepção. Pode ser encontrado tanto no sistema nervoso

central quanto no periférico. Ela é secretada pelos nervos sensitivos específicos e por células com função inflamatória como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas e atua ligando-se ao receptor da neuroquinina-1 (NK-1R). (STEINHOFF et al., 2014) As taucinininas possuem três receptores identificados, NK-1, NK-2 e NK-3, todos acoplados à proteína G, cada um com variada distribuição entre tecidos e tipos celulares. As taucinininas interagem com os três receptores, porém com afinidades, mecanismos de sensibilização distintos.

A presença de substância P de origem neural na pele parece fortemente controlada pela disponibilidade do fator de crescimento neural sintetizado pelas células da pele, especialmente por queratinócitos. A substância P é capaz, ainda, de estimular a proliferação de células de musculatura lisa arterial e de fibroblastos, a proliferação de células endoteliais e a neovascularização *in vivo*. Seus efeitos positivos sobre a proliferação de queratinócitos em cultura, entretanto, parecem depender da ação indutiva do VIP. Mesmo carecendo de trabalhos experimentais definitivos, evidências crescentes sugerem participação ativa da inervação da pele em seus fenômenos homeostáticos e patológicos. No entanto, em contraste com numerosos dados experimentais, um componente neural na etiopatogenia da maioria das dermatoses humanas permanece não elucidado, inclusive para os queloides. (DONNERER; SCHULIGOI; STEIN, 1992; FOREMAN, 1987; JOHANSSON; FANTINI; HU, 1999; LOTTI; HAUTMANN; PANCONESI, 1995; SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997; WALLENGREN; HAKANSON, 1987; ZANCANARO et al., 1999)

Em relação à expressão de iNOS nos queloides, o estudo não foi representativo pelo fato das amostras terem sido indetectáveis. O NO é produzido pela óxido nítrico sintase que existe em três isoformas, NOS induzível NOS endotelial e NOS neuronal. Um equilíbrio entre a concentração de óxido nítrico biodisponível e um nível de estresse oxidativo em feridas pode ser crucial no reparo da ferida. O efeito altamente benéfico de biodisponibilidade do NO é atribuído à eliminação do superóxido, que é o principal componente do estresse oxidativo. Portanto, uma estratégia geral para uma aceleração do processo de cicatrização de feridas pode incluir uma intervenção que leva à diminuição do estresse oxidativo (tratamento com antioxidantes). (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005)

Estudos subsequentes sobre o importância da iNOS e da biodisponibilidade do óxido nítrico na cicatrização de feridas são conflitantes, dependendo em grande parte

modelo de ferida utilizado. Estudos prévios sugerem que o óxido nítrico, presente na epiderme basal e na derme, possa atuar como radical livre estimulando a síntese de colágeno em cicatrizes queloidianas, onde se observa um aumento da expressão de iNOS quando comparado à pele normal. Sendo assim, o NO pode ser considerado um fator de crescimento pró-fibrótico. Fato que não pode ser confirmado por esse estudo, pelo fato da dosagem dessa molécula ter sido indetectável. (COBBOLD, 2001)

Sugere-se que o óxido nítrico seja sintetizado por um amplo espectro de células dérmicas, e durante a cicatrização estimula a produção de matriz extracelular, colágeno. (SCHAFFER, M. R. et al., 1997) Experiências *in vitro* demonstraram comprometimento da cicatrização após a aplicação de um inibidor de óxido nítrico. Esta característica destaca um papel potencialmente importante para o óxido nítrico no excesso de síntese do colágeno, corroborada por um trabalho experimental que demonstra que a transfecção da iNOS aumenta o acúmulo de colágeno. (THORNTON et al., 1998) Consequentemente, hipotetiza-se que a cicatriz queloidiana está associada com maior quantidade de óxido nítrico, em relação às taxas normais da pele. (HSU et al., 2006)

Portanto, a alta biodisponibilidade de NO em feridas é importante para melhorar o processo de cicatrização. Vários estudos têm sido feito com foco no aumento dos níveis de NO nas feridas ou pela entrega de doadores de NO e de substrato arginina, conhecido por ser um aminoácido essencial na cicatrização de feridas. Animais tratados com L-arginina mostram aumento da deposição de colágeno em relação ao controle. (DISSEMOND; GOOS; WAGNER, 2002; SEIFTER et al., 1978)

Porém a literatura é conflitante no que tange a associação de óxido nítrico e cicatrização. Até o presente momento, não há tratamento inteiramente efetivo para lesões queloidianas, no entanto, uma das terapias existentes bem sucedidas envolve excisão combinada com administração intralesional de corticosteroides. Pode-se interpretar a eficácia deste tratamento pelo fato de que os corticosteroides suprimem a iNOS, uma das enzimas que sintetizam o óxido nítrico. Assim, a terapia inibe parcialmente a produção de óxido nítrico e, em alguns casos leves de queloides, isso poderia ser suficiente para evitar a recorrência. No entanto, podemos explicar também a ausência de sucesso completo dos corticosteroides, visto que eles não inibem a óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), que é uma enzima que está envolvida na produção de óxido nítrico pelos queratinócitos. Os queratinócitos são a principal fonte do excesso de óxido nítrico presente nos queloides, e, portanto, os corticoides causariam apenas uma inibição limitada

sobre a produção de óxido nítrico. (BERMAN; BIELEY, 1995; RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1990)

Outro estudo teve como objetivo investigar o efeito de NO sobre fibroblastos em queloides e determinar os níveis de expressão da iNOS em espécimes de queloide. A expressão de iNOS e a produção de NO foram elevadas nos tecidos cicatriciais queiloideanos mas não em tecidos de pele perilesional normal correspondentes. Além disso, a exposição de fibroblastos queiloideanos (cultura celular) ao NO exógeno resultou em aumento da expressão de colágeno tipo I de uma maneira dose-dependente. Em conjunto, esses resultados indicam que o excesso de formação de colágeno no queiloide pode ser atribuído à expressão aumentada do iNOS. (HSU et al., 2006)

Outra pesquisa prévia hipotetizou que a interação entre TGF- β e NO nos queloides poderia promover a deposição excessiva de colágeno associada a este transtorno. iNOS apresentou uma elevação significativa nos queloides em comparação à pele normal. Apesar de estar documentado que TGF β tem um efeito de *feedback* negativo sobre iNOS, demonstra-se uma *co-upregulation* de TGF β 1 e iNOS em quelóides. Assim, no queiloide NO é tão importante como o fator de crescimento pró-fibrotico quanto TGF β 1 e ambos poderiam ser trabalhados em coordenação. Portanto, o equilíbrio entre TGF β e NOS poderia ter muita importância, ao afetar as células queiloideanas através de efeitos autócrinos e parácrinos e poderia desempenhar conjuntamente um papel na patogênese do queiloide. Em conclusão, entender as ações de TGF β e NOS na cicatriz queiloideana pode levar ao desenvolvimento de agentes anti-fibróticos combinados clinicamente úteis. (EL-ALEEM, S. A. A., SOHA ; OSMAN, NOURA MOHAMED SABER 2017)

Para análise da expressão *in situ* de FGF nas cicatrizes queiloideanas e normais, o estudo não foi conclusivo por um baixo número de amostras detectadas durante qPCR. Conforme achados da literatura, sabe-se que a família dos FGF é composta de 22 membros estruturalmente relacionados. A maioria dos membros desta família possui um amplo espectro de ação mitogênica, em células de origem mesodérmica, ectodérmica e endodérmica. Efeitos demonstrados *in vivo* são sugestivos do envolvimento destes fatores de crescimento com o processo de reparo tecidual. Os FGFs são mitogênicos para vários tipos celulares presentes no tecido lesado, incluindo fibroblastos e queratinócitos. (ABRAHAM, 1996)

Em lesão por queimadura em ratos, foi detectada imunoreatividade na regeneração da epiderme para o FGF que foi acompanhada de melhor regeneração dessa formação de

tecido de granulação e renovação capilar. (KIBE; TAKENAKA; KISHIMOTO, 2000) Este fator foi também detectado nas margens de queimaduras em humanos. (GIBRAN et al., 1994) Posteriormente, foi verificado que seu RNAm era predominantemente detectado em fibroblastos da derme e em tecido de granulação de humanos e de camundongos. (MARCHESE et al., 1995; WERNER et al., 1992) O FGF estimula o crescimento da matriz extracelular. A administração de FGF recombinante para feridas na pele pode acelerar a cicatrização de feridas crônicas, o que significa que FGF desempenha um papel fundamental para a cicatrização de feridas. Mas ainda um papel com definição incerta nas patologias cicatriciais quelóideas. (ORNITZ; ITOH, 2001)

Em relação aos alvos estudados, após preparo do material para análise de citocinas, verificamos que um expressivo número de pacientes e controles não apresentaram amplificação para cDNA para TAC1, TAC-R1, VIP, iNOS e FGF. Portanto, as amostras não foram detectáveis, e não podemos inferir nenhum resultado em relação a essas substâncias através desse estudo. De todas elas, a única associação com cicatriz quelóidea definida pela literatura até o momento é o FGF. As demais não possuem, até o momento, expressão confirmada na literatura na fisiopatogenia do quelóide. Sendo assim, os achados para essas moléculas não são considerados conclusivos, e não podemos fazer inferências com os dados disponíveis até então, apesar de que esses dados não devem ser desprezados, visto que a literatura comprova associação clara da expressão dessas moléculas com o processo de cicatrização normal e patológica e com processos inflamatórios da pele.

O achado não condizente com a literatura da diferença de expressão de citocinas já estudadas entre cicatrizes normais e os quelóides também pode ter sido resultado da interferência do uso de corticoide na amostra tecidual, ou dos diferentes tempos de evolução das amostras cicatriciais obtidas, em diferentes fases da cicatrização. Apesar de que, diferenças significativas obtidas na expressão de TFG- β , IL-22 e ARG-1 ocorreram mesmo sob influência da corticoterapia local, fato que ainda deve ser investigado no futuro. Não se sabe o real efeito da triancinolona intralesional utilizada sobre as substâncias estudadas, mas pode representar um viés, ainda a ser esclarecido. Para maior esclarecimento, são necessários novos estudos que objetivem comparar quelóides com e sem influência do uso de corticoide intralesional, e qual seu real efeito sobre as citocinas e fatores de crescimento envolvidos na etiopatogenia dessas cicatrizes. O presente estudo não teve como objetivo a comparação das cicatrizes submetidas ou não ao efeito do

corticoide; apenas após a aplicação do protocolo de tratamento que se constatou que a maioria das cicatrizes eram ativas e com contraindicação à abordagem cirúrgica, mesmo para biópsia tecidual, pelo risco de reativação do quelóide com piora clínica, o que seria antiético e prejudicial ao paciente.

A corticoterapia é considerada o tratamento padrão para o quelóide há anos (URIESTE; ARNDT; DOVER, 1999) e diferentes CE já foram empregados em seu tratamento. A triancinolona é empregada para o tratamento de cicatrizes queloidianas desde 1966. (GRIFFITH, 1966)

A triancinolona é um importante corticosteroide fluoratado sintético, cuja atividade glicocorticoide é intensa e a atividade mineralocorticoide é diminuída. Acetonida de triancinolona foi o primeiro CE halogenado a ser amplamente usado de modo tópico para afecções de pele e mostrou-se mais efetivo do que os demais CE tópicos. Os efeitos dos corticoides são numerosos e amplos. Entre suas características, destacam-se ações anti-inflamatórias: prevenção ou supressão de fenômenos iniciais do processo inflamatório: calor, rubor, edema, dilatação capilar, migração dos leucócitos e fagócitos, bem como os tardios, que incluem proliferação de capilares e fibroblastos e deposição de colágeno. O mecanismo pelo qual a triancinolona infiltrada intradérmica age no local da lesão não está totalmente elucidado. Sabe-se que seu efeito maior é no processo inflamatório, mas também controla manifestações posteriores como proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e cicatrização. (HARVEY, 1973)

Há evidências substanciais de que a triancinolona inibe a migração dos fibroblastos e a síntese dos colágenos e a $\alpha 2$ macroglobulina, resultando na degradação do colágeno. Alguns autores acreditam que a regressão do quelóide, com o uso da TCN deve-se ao aumento da degradação do colágeno, elevando a atividade da colagenase. Esse corticoide ocasiona degeneração e fagocitose celular. (CARVALHAES et al., 2015; FERGUSON, 1994; FRANK, 1987; HARVEY, 1973; KETCHUM; ROBINSON; MASTERS, 1971; KRUSCHE; WORRET, 1995; URIESTE et al., 1999) Alguns estudos afirmam que o corticoide possui influência mais forte sobre as células endoteliais do que sobre os fibroblastos da cicatriz, inibindo a angiogênese, reduzindo o fluxo sanguíneo local, acarretando também vasoconstrição e isquemia, e redução do aporte de citocinas inflamatórias para o quelóide. Dessa forma induziria a regressão da cicatriz e inativação de sua fase inflamatória, com melhora dos sintomas locais.

Sabe-se que a triancinolona é um glicocorticóide sintético com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Após a entrada celular, a triancinolona se liga e ativa

o receptor de glicocorticóides, o que leva à translocação do complexo ligante-receptor para o núcleo e induz a expressão de genes responsivos a glicocorticóides, como lipocortinas. As lipocortinas inibem a fosfolipase A2, bloqueando assim a liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membrana e impedindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, ambos mediadores da inflamação. Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina IL -1 e IL-6, e a ativação de linfócitos T citotóxicos também são inibidas. As células T são impedidas de produzir IL-2 e proliferar. Como já citado, a triancinolona inibe a proliferação de fibroblastos, inibe a síntese de colágeno, reduz a inflamação e aumenta a vasoconstrição no tecido cicatricial e, por fim, induz a regressão da cicatriz. (HIETANEN, 2016)

A infiltração da base do quelóide com corticoide tem o propósito de atuar no local onde penetram os mediadores do processo cicatricial e onde se encontram os fibroblastos com capacidade replicativa. A contenção da droga em pequenos volumes no local da cicatriz reduz seus efeitos sistêmicos. A corticoterapia pré-operatória teve por objetivo reduzir a intensidade da cascata da cicatrização. A concentração de 10 mg/ml é insuficiente para o tratamento do quelóide, pois 50% dos pacientes não apresentam regressão dos sintomas de prurido e dor nem melhora do aspecto da cicatriz. Considerando que a concentração de 10 mg/ml de triancinolona é ineficaz e que não existe diferença entre as concentrações de 20 mg/ml e 40 mg/ml no tratamento dos quelóides, é pertinente propor 20 mg/ml como a menor concentração eficaz no tratamento do quelóide. (CARVALHAES et al., 2015)

No entanto, mesmo sob efeito triancinolona foram observadas diferenças significativas na expressão do RNAm para TGF- β , IL-22 e ARG-1. Isso pode ser explicado pelo fato de a dose de corticoide utilizada não ter sido suficiente para modular a expressão do RNAm dessas citocinas, ou devido à polimorfismos genéticos que deixam esses indivíduos resistentes à ação da triancinolona para estas citocinas. (VAN OOSTEN et al., 2010) Porém, essas hipóteses precisam ser futuramente validadas.

Em relação à betaterapia, apesar de ser um tratamento considerado padrão-ouro quando associado à cirurgia, não é um serviço disponível pelo SUS na cidade de Uberaba, e possui custo elevado, o que restringe sua indicação. Temos reservado a betaterapia para os casos mais agressivos, extensos, múltiplos e recidivantes, cujos tratamentos prévios resultaram em insucesso, seja através de cirurgia ou corticoterapia.

6- CONCLUSÃO

O estudo da expressão de RNAm para citocinas e fatores de crescimento em pacientes com quelóide quando comparado às cicatrizes normais, evidenciou diferença significativamente maior na expressão de TFG- β , IL-22 e ARG-1 nas cicatrizes quelóideanas. Enquanto que os achados para IL-33, ARG-2 e VIP-R1, apesar da maior expressão dos pacientes com quelóide, não foram significativos. E, por fim, a análise das cópias de RNAm para FGF, TAC-1, TAC-R1, VIP e iNOS foram inconclusivas, por níveis não detectáveis das amostras durante o estudo. Esses achados não devem tornar esses fatores menos importantes. A expressão não conclusiva dessas últimas moléculas não exclui a associação delas com quelóides e cicatrização anormal.

Portanto, entender os mecanismos celulares e moleculares que controlam a resposta inflamatória durante a cicatrização cutânea poderá promover estratégias para melhorar o tratamento de milhares de pacientes afetados pelas patologias cicatriciais ao redor do mundo. Relevante também é o fato de ser limitado, até o momento, o repertório terapêutico para tratamento dos quelóides. Enfim, novos estudos para o entendimento da associação dessas moléculas com os quelóides se fazem necessários.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J. A. K., M. Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**, v. 2, n. 195-248, 1996.

AGBENORKU, P. Triple keloid therapy: a combination of steroids, surgery and silicone gel strip/sheet for keloid treatment. . **European Journal of Plastic Surgery**, v. 23, n. 3, p. 150-151, 2000.

AKAISHI, S. et al. The relationship between keloid growth pattern and stretching tension: visual analysis using the finite element method. **Ann Plast Surg**, v. 60, n. 4, p. 445-51, Apr 2008.

AKITA, S. et al. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 5, p. 635-41, Sep-Oct 2008.

AL-ATTAR, A. et al. Keloid pathogenesis and treatment. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 1, p. 286-300, Jan 2006.

ANSEL, J. C. et al. Skin-nervous system interactions. **J Invest Dermatol**, v. 106, n. 1, p. 198-204, Jan 1996.

APPLETON, I.; BROWN, N. J.; WILLOUGHBY, D. A. Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids. **Am J Pathol**, v. 149, n. 5, p. 1441-7, Nov 1996.

ASHRAFI, M.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. The Role of Neuromediators and Innervation in Cutaneous Wound Healing. **Acta Derm Venereol**, v. 96, n. 5, p. 587-94, Jun 15 2016.

BACHETTI, T. et al. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 2, p. 515-23, Aug 2004.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 235-53, Mar 2009.

BERMAN, B.; BIELEY, H. C. Keloids. **J Am Acad Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 117-23, Jul 1995.

BETTINGER, D. A. et al. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. **Plast Reconstr Surg**, v. 98, n. 5, p. 827-33, Oct 1996.

BOTTINGER, E. P.; LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. **Kidney Int**, v. 51, n. 5, p. 1355-60, May 1997.

BROWN, J. J. et al. Genetic susceptibility to keloid scarring: SMAD gene SNP frequencies in Afro-Caribbeans. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 7, p. 610-3, Jul 2008.

BRUCH-GERHARZ, D. et al. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. **Am J Pathol**, v. 162, n. 1, p. 203-11, Jan 2003.

BRUDNIK, U.; PODOLEC-RUBIS, M.; WOJAS-PELC, A. [Therapeutic problems connected with keloid treatment--new treatment possibilities]. **Przegl Lek**, v. 63, n. 9, p. 803-6, 2006.

CALDWELL, R. B. et al. Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends Pharmacol Sci**, v. 36, n. 6, p. 395-405, Jun 2015.

CAMPBELL, L. et al. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 10, p. 2461-2470, Oct 2013.

CARVALHAES, S. M. et al. Assesment of the treatment of earlobe keloids with triamcinolone injections, surgical resection, and local pressure. **Rev Col Bras Cir**, v. 42, n. 1, p. 9-13, Jan-Feb 2015.

CHANG, C. I.; LIAO, J. C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am J Physiol**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. H342-8, Jan 1998.

CHEN, S. J. et al. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. **J Invest Dermatol**, v. 112, n. 1, p. 49-57, Jan 1999.

CHIN, G. S. et al. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts. **Plast Reconstr Surg**, v. 108, n. 2, p. 423-9, Aug 2001.

CHRISTOPHI, G. P. et al. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. **Clin Immunol**, v. 142, n. 3, p. 308-19, Mar 2012.

COBBOLD, C. A. The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions. **Med Hypotheses**, v. 57, n. 4, p. 497-502, Oct 2001.

DATUBO-BROWN, D. D. Keloids: a review of the literature. **Br J Plast Surg**, v. 43, n. 1, p. 70-7, Jan 1990.

DELGADO, M. et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. **J Mol Med (Berl)**, v. 80, n. 1, p. 16-24, Jan 2002.

DELGADO, M.; POZO, D.; GANEA, D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 2, p. 249-90, Jun 2004.

DICKSON, L.; FINLAYSON, K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. **Pharmacol Ther**, v. 121, n. 3, p. 294-316, Mar 2009.

DIEZ-MARQUES, L. et al. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, n. 1, p. 36-44, May 21 2002.

DISSEMOND, J.; GOOS, M.; WAGNER, S. N. [The role of oxidative stress in the pathogenesis and therapy of chronic wounds]. **Hautarzt**, v. 53, n. 11, p. 718-23, Nov 2002.

DONG, X.; MAO, S.; WEN, H. Upregulation of proinflammatory genes in skin lesions may be the cause of keloid formation (Review). **Biomed Rep**, v. 1, n. 6, p. 833-836, Nov 2013.

DONKOR, P. Head and neck keloid: treatment by core excision and delayed intralesional injection of steroid. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 7, p. 1292-6, Jul 2007.

DONNERER, J.; SCHULIGOI, R.; STEIN, C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. **Neuroscience**, v. 49, n. 3, p. 693-8, Aug 1992.

DUMOUTIER, L.; LOUAHED, J.; RENAULD, J. C. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 1814-9, Feb 15 2000.

EL-ALEEM, S. A., S. ABDELWAHAB, AND N. M. S. OSMAN. Co-upregulation of Transforming Growth Factor Beta-1 and Nitric Oxide Synthase in Keloid by Comparison to Normal Human Skin- A Possible Role for TGFβ1 and NOS in Pathogenesis of Keloid. **Journal Cytology Histology**, v. 8, 2017.

EL-ALEEM, S. A. A., SOHA ; OSMAN, NOURA MOHAMED SABER Co-upregulation of Transforming Growth Factor Beta-1 and Nitric Oxide Synthase in Keloid by comparison to normal human skin- A possible role for TGFβ1 and NOS in pathogenesis of keloid. **Journal of Cytology & Histology**, v. 8, 2017.

ELIAS, J. A. et al. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J Immunol**, v. 138, n. 11, p. 3812-6, Jun 1 1987.

FERGUSON, G. Intralesional steroid injection following keloid surgery. **Plast Reconstr Surg**, v. 93, n. 3, p. 643, Mar 1994.

FERREIRA, L. M. et al. Control of the skin scarring response. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 623-9, Sep 2009.

FOREMAN, J. C. Peptides and neurogenic inflammation. **Br Med Bull**, v. 43, n. 2, p. 386-400, Apr 1987.

FRANK, M. M. Complement in the pathophysiology of human disease. **N Engl J Med**, v. 316, n. 24, p. 1525-30, Jun 11 1987.

FROJMOVIC, M. M.; MILTON, J. G. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. **Physiol Rev**, v. 62, n. 1, p. 185-261, Jan 1982.

FURTADO, F. et al. Psychological stress as a risk factor for postoperative keloid recurrence. **J Psychosom Res**, v. 72, n. 4, p. 282-7, Apr 2012.

FURTADO, F.; HOCHMAN, B.; FERREIRA, L. M. Evaluating keloid recurrence after surgical excision with prospective longitudinal scar assessment scales. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 65, n. 7, p. e175-81, Jul 2012.

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 4, p. 485-92, Jul-Aug 2004.

GAUGLITZ, G. G. Management of keloids and hypertrophic scars: current and emerging options. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 6, p. 103-14, 2013.

GIBRAN, N. S. et al. Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. **J Surg Res**, v. 56, n. 3, p. 226-34, Mar 1994.

GOLD, M. H. et al. 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. 641-4, Jul 2001.

GONZALEZ, A. C. D. O. C., TILA FORTUNA; MEDRADO, ALENA RIBEIRO ALVES PEIXOTO. Wound healing: A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-20, 2016.

GONZALEZ, C. et al. Neuronal nitric oxide synthase activation by vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 17, n. 9, p. 977-84, Sep 1997.

GOTOH, T.; MORI, M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. **J Cell Biol**, v. 144, n. 3, p. 427-34, Feb 8 1999.

GRIFFITH, B. H. The treatment of keloids with triamcinolone acetonide. **Plast Reconstr Surg**, v. 38, n. 3, p. 202-8, Sep 1966.

HARVEY, W. G., R. . Effect of same adrenal steroid hormones on skin fibroblast replication in vivo. **Ann Rheum**, v. 32, p. 272, 1973.

HIETANEN, K. E. K., H.O; KAARTINEN, I; VÄLISUO, P Long-Term Results of Intralesional Triamcinolone Acetonide Injections in Keloid Treatment. **J Clin Trials**, v. 6, n. 278, 2016.

HOCHMAN, B. Distribuição de quelóide e cicatriz hipertrófica segundo fototipos de pele de Fitzpatrick. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, 2012.

HOCHMAN, B. et al. New approach to the understanding of keloid: psychoneuroimmune-endocrine aspects. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 8, p. 67-73, 2015.

HOCHMAN, B. et al. Intralesional triamcinolone acetonide for keloid treatment: a systematic review. **Aesthetic Plast Surg**, v. 32, n. 4, p. 705-9, Jul 2008.

HOCHMAN, B., LOCALI, R. F., OLIVEIRA, L. Q. R., FERREIRA, L. M. Disfunções cicatriciais hiperproliferativas: Queloides. **Estima**, v. 4, n. 4, p. 33-39, 2004.

HOCHMAN, B. et al. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. **Br J Dermatol**, v. 158, n. 3, p. 651-2, Mar 2008.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 739-68, Mar 1988.

HSU, Y. C. et al. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. **Nitric Oxide**, v. 14, n. 4, p. 327-34, Jun 2006.

HUANG, C.; OGAWA, R. The link between hypertension and pathological scarring: does hypertension cause or promote keloid and hypertrophic scar pathogenesis? **Wound Repair Regen**, v. 22, n. 4, p. 462-6, Jul-Aug 2014.

JACOBSEN, L. C. et al. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 3084-7, Apr 1 2007.

JIANG, W. Y. et al. Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. **Int J Dermatol**, v. 40, n. 11, p. 699-703, Nov 2001.

JOHANSSON, O.; FANTINI, F.; HU, H. Neuronal structural proteins, transmitters, transmitter enzymes and neuropeptides in human Meissner's corpuscles: a reappraisal using immunohistochemistry. **Arch Dermatol Res**, v. 291, n. 7-8, p. 419-24, Jul-Aug 1999.

JUN, J. I.; LAU, L. F. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 9, p. 627-31, Sep 2010a. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 7, p. 676-85, Jul 2010b.

KAMPFER, H.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. **J Invest Dermatol**, v. 121, n. 6, p. 1544-51, Dec 2003.

KANE, C. J. et al. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. **J Cell Physiol**, v. 148, n. 1, p. 157-73, Jul 1991.

KETCHUM, L. D.; ROBINSON, D. W.; MASTERS, F. W. Follow-up on treatment of hypertrophic scars and keloids with triamcinolone. **Plast Reconstr Surg**, v. 48, n. 3, p. 256-9, Sep 1971.

KIBE, Y.; TAKENAKA, H.; KISHIMOTO, S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. **Br J Dermatol**, v. 143, n. 4, p. 720-7, Oct 2000.

KIM, H. D. et al. Recurrent Auricular Keloids during Pregnancy. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 1, p. 70-2, Jan 2013.

KISCHER, C. W.; SHETLAR, M. R.; CHVAPIL, M. Hypertrophic scars and keloids: a review and new concept concerning their origin. **Scan Electron Microsc**, n. Pt 4, p. 1699-713, 1982.

KISCHER, C. W. et al. Increased fibronectin production by cell lines from hypertrophic scar and keloid. **Connect Tissue Res**, v. 23, n. 4, p. 279-88, 1989.

KONG, X. et al. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 56, n. 3, p. 1150-9, Sep 2012.

KOONIN, A. J. The Aetiology of Keloids: A Review of the Literature and a New Hypothesis. **S Afr Med J**, v. 38, p. 913-6, Nov 21 1964.

KOTENKO, S. V. et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 4, p. 2725-32, Jan 26 2001.

KRUSCHE, T.; WORRET, W. I. Mechanical properties of keloids in vivo during treatment with intralesional triamcinolone acetonide. **Arch Dermatol Res**, v. 287, n. 3-4, p. 289-93, 1995.

KULASEKARAN, P. et al. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 41, n. 4, p. 484-93, Oct 2009.

KULKARNI, A. B.; KARLSSON, S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. **Am J Pathol**, v. 143, n. 1, p. 3-9, Jul 1993.

LANE, J. E.; WALLER, J. L.; DAVIS, L. S. Relationship between age of ear piercing and keloid formation. **Pediatrics**, v. 115, n. 5, p. 1312-4, May 2005.

LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. **FASEB J**, v. 18, n. 7, p. 816-27, May 2004.

LEJEUNE, D. et al. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. **J Biol Chem**, v. 277, n. 37, p. 33676-82, Sep 13 2002.

LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 310, n. 2, p. 175-83, Dec 1979.

LEUNG, M. S.; WONG, C. C. Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats. **Life Sci**, v. 66, n. 16, p. 1481-90, 2000.

LI, H. et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 1, p. E75-82, Jan 2001.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 103-10, Feb 2010.

LIU, C. Y. C., S. Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis. **Adv Exp Biol Med**, p. 281, 1990.

LIU, W.; WANG, D. R.; CAO, Y. L. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. **Curr Gene Ther**, v. 4, n. 1, p. 123-36, Mar 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOKE, P. et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3926-36, Sep 15 2007.

LOTTI, T.; HAUTMANN, G.; PANCONESI, E. Neuropeptides in skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 33, n. 3, p. 482-96, Sep 1995.

LOWRY, S. F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. **Arch Surg**, v. 128, n. 11, p. 1235-41, Nov 1993.

MARCHESE, C. et al. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1369-76, Nov 1 1995.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, Apr 4 1997.

MCCAULEY, R. L. et al. Altered cytokine production in black patients with keloids. **J Clin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 300-8, Jul 1992.

MCGEE, H. M. et al. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 5, p. 1321-9, May 2013.

MORRIS, S. M., JR. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 6, p. 922-30, Jul 2009.

MUNDER, M. et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1627-34, Sep 1 2006.

NAKASHIMA, M. et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. **Nat Genet**, v. 42, n. 9, p. 768-71, Sep 2010.

NICOLETIS, C.; BAZIN, S.; LOUS, M. L. Clinical and biochemical features of normal, defective, and pathologic scars. **Clin Plast Surg**, v. 4, n. 3, p. 347-59, Jul 1977.

NUNES, Q. M. et al. Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. **PeerJ**, v. 4, p. e1535, 2016.

OCHOA, J. B. et al. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. **Ann Surg**, v. 233, n. 3, p. 393-9, Mar 2001.

OGAWA, R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 3, Mar 10 2017.

OLUWASANMI, J. O. Keloids in the African. **Clin Plast Surg**, v. 1, n. 1, p. 179-95, Jan 1974.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001.

OVERALL, C. M.; WRANA, J. L.; SODEK, J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. **J Biol Chem**, v. 264, n. 3, p. 1860-9, Jan 25 1989.

PARK, T. H.; CHANG, C. H. Location of Keloids and Its Treatment Modality May Influence the Keloid Recurrence in Children. **J Craniofac Surg**, v. 26, n. 4, p. 1355-7, Jun 2015.

PARK, T. H. et al. Outcomes of surgical excision with pressure therapy using magnets and identification of risk factors for recurrent keloids. **Plast Reconstr Surg**, v. 128, n. 2, p. 431-9, Aug 2011.

QUERFELD, C. et al. Expression of TGF-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in localized and systemic scleroderma. **J Dermatol Sci**, v. 21, n. 1, p. 13-22, Sep 1999.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 24, p. 10043-7, Dec 1990.

RAK, G. D. et al. IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. **J Invest Dermatol**, v. 136, n. 2, p. 487-496, Feb 2016.

RAYAN, G. M. et al. Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. **J Okla State Med Assoc**, v. 88, n. 8, p. 337-41, Aug 1995.

REIS, A. Principais características das cicatrizes queiloideanas. **An Bras Dermatol**, v. 69, n. 6, p. 495-7, 1994.

REUBI, J. C. et al. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. **Cancer Res**, v. 60, n. 11, p. 3105-12, Jun 1 2000.

ROCKWELL, W. B.; COHEN, I. K.; EHRLICH, H. P. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. **Plast Reconstr Surg**, v. 84, n. 5, p. 827-37, Nov 1989.

ROQUES, C.; TEOT, L. The use of corticosteroids to treat keloids: a review. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 7, n. 3, p. 137-45, Sep 2008.

ROSEN, D. J. et al. A primary protocol for the management of ear keloids: results of excision combined with intraoperative and postoperative steroid injections. **Plast Reconstr Surg**, v. 120, n. 5, p. 1395-400, Oct 2007.

SALLSTROM, K. O. et al. Treatment of keloids with surgical excision and postoperative X-ray radiation. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v. 23, n. 3, p. 211-5, 1989.

SAVINKO, T. et al. ST2 regulates allergic airway inflammation and T-cell polarization in epicutaneously sensitized mice. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 11, p. 2522-2529, Nov 2013.

SCHAFFER, M. et al. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? **Arch Surg**, v. 133, n. 10, p. 1107-16, Oct 1998.

SCHIERLE, H. P.; SCHOLZ, D.; LEMPERLE, G. Elevated levels of testosterone receptors in keloid tissue: an experimental investigation. **Plast Reconstr Surg**, v. 100, n. 2, p. 390-5; discussion 396, Aug 1997.

SCHMID, P. et al. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. **Am J Pathol**, v. 152, n. 2, p. 485-93, Feb 1998.

SCHOLZEN, T. et al. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. **Exp Dermatol**, v. 7, n. 2-3, p. 81-96, Apr-Jun 1998.

SCLAFANI, A. P. et al. Prevention of earlobe keloid recurrence with postoperative corticosteroid injections versus radiation therapy: a randomized, prospective study and review of the literature. **Dermatol Surg**, v. 22, n. 6, p. 569-74, Jun 1996.

SEIFTER, E. et al. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery**, v. 84, n. 2, p. 224-30, Aug 1978.

SHAMSI MEYMANDI, S.; REZAZADEH, A.; EKHLASI, A. Studying intense pulsed light method along with corticosteroid injection in treating keloid scars. **Iran Red Crescent Med J**, v. 16, n. 2, p. e12464, Feb 2014.

SHI, H. P. et al. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, v. 128, n. 2, p. 374-8, Aug 2000.

SLEMP, A. E.; KIRSCHNER, R. E. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. **Curr Opin Pediatr**, v. 18, n. 4, p. 396-402, Aug 2006.

SMITH, C. J.; SMITH, J. C.; FINN, M. C. The possible role of mast cells (allergy) in the production of keloid and hypertrophic scarring. **J Burn Care Rehabil**, v. 8, n. 2, p. 126-31, Mar-Apr 1987.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacol Rep**, v. 57 Suppl, p. 108-19, 2005.

SONG, C. Hypertrophic scars and keloids in surgery: current concepts. **Ann Plast Surg**, v. 73 Suppl 1, p. S108-18, Sep 2014.

STEINHOFF, M. S. et al. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. **Physiol Rev**, v. 94, n. 1, p. 265-301, Jan 2014.

SZEZERBATY, S. K. F. Análise das estruturas celulares, citotoxicidade e modulação da expressão gênica em células fibroblásticas (I929) submetidas à terapia laser de baixa potência. 2016.

TAN, K. T. et al. The influence of surgical excision margins on keloid prognosis. **Ann Plast Surg**, v. 64, n. 1, p. 55-8, Jan 2010.

TANAYDIN, V. et al. Efficacy of custom-made pressure clips for ear keloid treatment after surgical excision. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 69, n. 1, p. 115-21, Jan 2016.

TANIGUCHI, K. et al. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 23, n. 6, p. 428-34, 2013.

THORNTON, F. J. et al. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 246, n. 3, p. 654-9, May 29 1998.

TRISLIANA PERDANASARI, A. et al. Recent developments in the use of intralesional injections keloid treatment. **Arch Plast Surg**, v. 41, n. 6, p. 620-9, Nov 2014.

URIOSTE, S. S.; ARNDT, K. A.; DOVER, J. S. Keloids and hypertrophic scars: review and treatment strategies. **Semin Cutan Med Surg**, v. 18, n. 2, p. 159-71, Jun 1999.

VAN OOSTEN, M. J. et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 4, p. R159, 2010.

VARGA, J.; JIMENEZ, S. A. Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 138, n. 2, p. 974-80, Jul 31 1986.

WAHL, S. M. et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 16, p. 5788-92, Aug 1987.

WALLENGREN, J. Vasoactive peptides in the skin. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 2, n. 1, p. 49-55, Aug 1997.

WALLENGREN, J.; HAKANSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. **Eur J Pharmacol**, v. 143, n. 2, p. 267-73, Nov 10 1987.

WANG, H. et al. Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. **J Neuroimmunol**, v. 130, n. 1-2, p. 155-62, Sep 2002.

WANG, S. et al. IL-33: a potential therapeutic target in autoimmune diseases. **J Investig Med**, v. 60, n. 8, p. 1151-6, Dec 2012.

WERNER, S. et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 15, p. 6896-900, Aug 1 1992.

WILLIAMS, J. Z.; ABUMRAD, N.; BARBUL, A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. **Ann Surg**, v. 236, n. 3, p. 369-74; discussion 374-5, Sep 2002.

WITTE, M. B. et al. Arginase acts as an alternative pathway of L-arginine metabolism in experimental colon anastomosis. **J Gastrointest Surg**, v. 7, n. 3, p. 378-85, Mar-Apr 2003.

WOHLRAB, J.; SIEMES, C.; MARSCH, W. C. The influence of L-arginine on the regulation of epidermal arginase. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v. 15, n. 1, p. 44-54, Jan-Feb 2002.

WOLK, K. et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 241-54, Aug 2004.

WOLK, K. et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 5, p. 1309-23, May 2006.

WOLLINA, U. K., B; PRUFER, K. . Vasoactive intestinal peptide (VIP) supports migration and growth of human keratinocytes on polyurethane foils. **J Dermatol Sci** v. 6, n. 1, 1993.

WONG, T. S. et al. The Efficacy of Triamcinolone Acetonide in Keloid Treatment: A Systematic Review and Meta-analysis. **Front Med (Lausanne)**, v. 3, p. 71, 2016.

XIE, M. H. et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. **J Biol Chem**, v. 275, n. 40, p. 31335-9, Oct 6 2000.

XU, W. et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. **FASEB J**, v. 18, n. 14, p. 1746-8, Nov 2004.

XU, W. et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9511-6, Aug 14 2001.

ZANCANARO, C. et al. Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. **J Anat**, v. 194 (Pt 3), p. 433-44, Apr 1999.

ZHANG, C. et al. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. **FASEB J**, v. 15, n. 7, p. 1264-6, May 2001.

ZHAO, A. et al. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 217-225 e1, Jul 2008.

8- ANEXOS

Anexo A. Termo de consentimento livre e esclarecido.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP
Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
CEP: 38025-100 – Uberaba(MG)
Telefone: (0**34) 3318-5776 - E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MAIORES DE IDADE

TÍTULO DO PROJETO: “Análise de polimorfismos genéticos e da expressão de citocinas, metaloproteases e inibidores de metaloproteases em queloides e cicatrizes hipertróficas”.

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo “**Análise de polimorfismos genéticos e da expressão de citocinas, metaloproteases e inibidores de metaloproteases em queloides e cicatrizes hipertróficas**”, por apresentar queloide, cicatriz hipertrófica ou cicatriz normal (controle). Os avanços na área ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é investigar a contribuição de fatores imunológicos (componentes que atuam no sistema de defesa do nosso organismo) e polimorfismos genéticos (alterações nos genes) para o desenvolvimento dessa alteração cicatricial e caso você participe, será necessário responder um questionário sobre cirurgias, histórico familiar, entre outros dados a serem analisados nessa pesquisa; será coletado de 5 a 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma nova coleta); e no momento da retirada da cicatriz será coletado algum fragmento da lesão. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga risco à sua vida. Você poderá ter algum desconforto na coleta de sangue. Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal de sua participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com esta pesquisa possam auxiliar no diagnóstico e tratamento desta doença, beneficiando pessoas em risco de desenvolvimento de queloide ou cicatriz hipertrófica.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo pois você será identificado com um número.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP
Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
CEP: 38025-100 – Uberaba(MG)
Telefone: (0**34) 3318-5776 - E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **“Análise da expressão de citocinas, metaloproteases e inibidores de metaloproteases em queloidese e cicatrizes hipertróficas”**.

Eu, _____,
li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo. Receberei uma via deste Termo.

Em relação ao armazenamento de material para futuras análises sujeitas a consulta ao CEP:

() concordo

() não concordo

Uberaba,//.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal
Identidade

Documento de

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores:

(34)33185434 Prof. Virmondos Rodrigues Junior/ Laboratório de Imunologia

(34) 33185489 Profa. Denise B. Rocha Rodrigues/ CEFORES - Laboratório de Imunologia

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone 3318-5776.

Anexo B. Proposta para prontuário de registro de pacientes.

IDENTIFICAÇÃO – DATA ATENDIMENTO – PRIMEIRA CONSULTA: _____

NOME: _____ RG- prontuário: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ RAÇA: () branca () negra () parda

HISTÓRIA FAMILIAR: _____ SEXO () F () M

ANAMNESE: _____

LOCALIZAÇÃO DO QUELÓIDE:

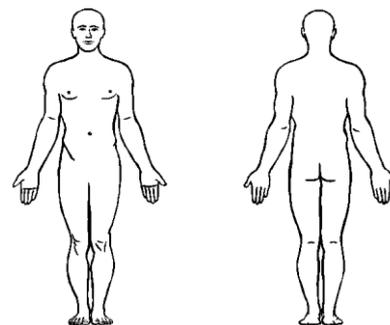
ORELHA () D () E () FACE () R.CERVICAL ()

R. OCCIPITAL () TÓRAX () ESTERNO () MAMAS ()

DORSO () ABDOME () UMBIGO ()

MMSS () MMII ()

OUTRO : _____



IDADE DE APARECIMENTO DA PRIMEIRA LESÃO: _____

NÚMERO DE LESÕES: _____ ETIOLOGIA (TRAUMA,

BRINCO, VACINA, ACNE, CIRURGIA):

BRINCO () PIERCING () VACINA () QUEIMADURA ()

TRAUMA () CIRURGIA () ACNE ()

PRESENÇA DE OUTRAS CICATRIZES: _____

CIRURGIAS PRÉVIAS: _____

COMORBIDADES: _____

MEDICAÇÕES EM USO: _____

TRATAMENTOS PRÉVIOS REALIZADOS:

CORTICÓIDE INTRALESIONAL/NÚMERO DE APLICAÇÕES _____

EXCISÃO CIRÚRGICA _____

BETATERAPIA __SIM () NÃO ()

COMPRESSÃO- MALHA ELÁSTICA () BRINCOS DE PRESSÃO () PLACAS DE SILICONE ()

CREMES TOPICOS: _____

RECIDIVA: __ () SIM () NÃO

ADESÃO AO TRATAMENTO: _____

EXAME FÍSICO: ATIVIDADE DO QUELÓIDE () ATIVO () INATIVO

TRATAMENTO ATUAL: COLETA DE DADOS PARA PESQUISA

() TERMO DE CONSENTIMENTO: _____

() DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: () ANTES TTO () DURANTE TTO () APÓS TTO

() CIRURGIA - DATA: _____ PROCEDIMENTO REALIZADO: _____

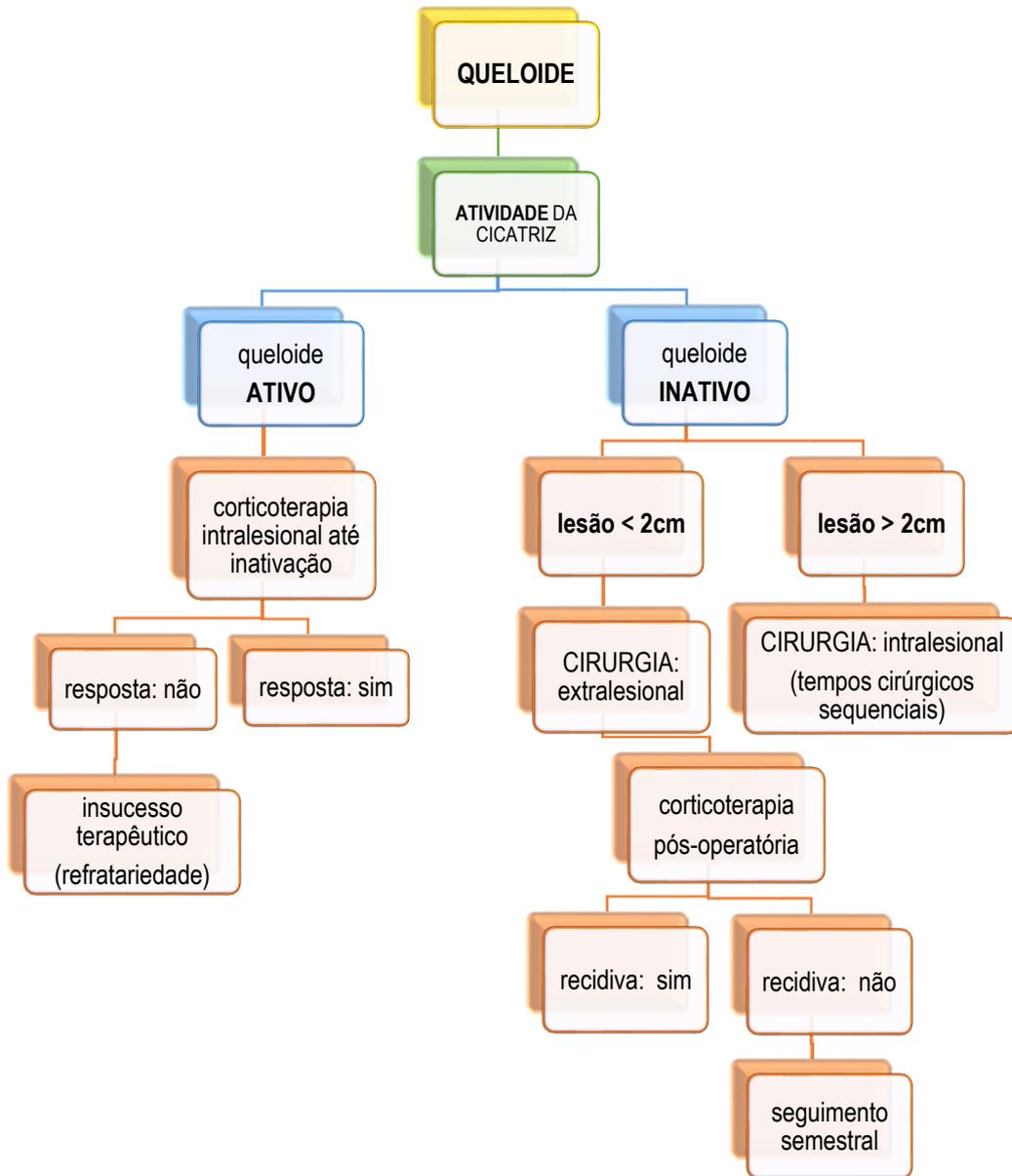
() BETATERAPIA PÓS-OPERATÓRIA: SIM () NÃO ()

() INFILTRAÇÃO CORTICÓIDE: TRIANCINOLONA 20 MG/ML – TRIANCIL- TOTAL DE APLICAÇÕES

() ANTES CIRURGIA: _____ () DEPOIS DA CIRURGIA : _____

SEGUIMENTO PÓS-TRATAMENTO : () SIM () NÃO TEMPO DE SEGUIMENTO : _____

Anexo C. Fluxograma de tratamento dos queloides.



Anexo D. *Primers do sistema Taqman (Applied Biosystems – EUA).*

PRIMER	CÓDIGO
TGF-β	Hs01555410_m1
FGF	Hs01092738_m1
IL-33	Hs00369211_m1
IL-22	Hs01574154_m1
ARG-1	Hs00163660_m1
ARG-2	Hs00982833_m1
VIP	Hs00175021_m1
VIP-R1 (VPAC1)	Hs00910453_m1
TAC1 (SP)	Hs00243225_m1
TAC-R1 (NK1-R)	Hs00185530_m1
iNOS	Hs01075529_m1
β-ACTINA (ACTB)	Hs01060665_g1